



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

**Síntesis y caracterización de nanopartículas de
quitosano - poliácido aspártico conteniendo isoniazida
para el tratamiento de tuberculosis**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química

AUTOR

Carmen Luz ZEGARRA URQUIA

ASESOR

Dr. Julio César SANTIAGO CONTRERAS

Lima, Perú

2015



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Zegarra, C. (2015). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de quitosano - políácido aspártico conteniendo isoniazida para el tratamiento de tuberculosis*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE QUÍMICA

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1

“Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático”

ACTA DE TITULACIÓN POR TESIS

Los suscritos miembros del Jurado, nombrados por la Dirección de la Escuela Académico Profesional de Química, bajo la Presidencia del Quím. MARCO VICENTE GUERRERO AQUINO (Presidente), El Quím. ALDO JAVIER GUZMAN DUXTAN (Miembro) y el Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la TESIS, titulada “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO - POLIÁCIDO ASPÁRTICO CONTENIENDO ISONIAZIDA PARA EL TRATAMIENTO DE TUBERCULOSIS”, después de SUSTENTADA Y APROBADA la TESIS elaborada por la Bachiller en Química: CARMEN LUZ ZEGARRA URQUIA; para optar el TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICO, acordaron calificarlo con la NOTA de:

Diecinueve

(LETRA)

19
(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 20 de marzo del 2015


Quím. MARCO VICENTE GUERRERO AQUINO
PRESIDENTE


Quím. ALDO JAVIER GUZMAN DUXTAN
MIEMBRO


Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
ASESOR


Dr. MARIO CERONI GALLOSO
DIRECTOR DE LA E.A.P. DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su bendición.

A mis padres por su gran amor y ejemplo.

Al Dr. Julio Santiago por su confianza depositada en mi persona para la ejecución de la presente tesis, por su orientación en el tema y por su apoyo.

A los jurados, Dr. Aldo Guzmán y al Profesor Marco Guerrero por sus aportes a la presente tesis durante la revisión de la misma.

Al Dr. Daniel Rabinovich, Departamento de Química, Universidad de Carolina del Norte en Charlotte (EE.UU.), por su apoyo en el envío de artículos científicos, del reactivo ácido isonicotínico y por las lecturas IR (ATR) y RMN.

A Norman Spencer, Departamento de Química, Universidad de Carolina del Norte en Charlotte (EE.UU.), por su apoyo en las lecturas IR (ATR).

Al Dr. Yván Olortiga, Instituto de Química de São Carlos, Universidad de São Paulo (Brasil), por su apoyo en las lecturas IR (KBr), DRX y SEM de las muestras de quitosano, poliaspartato, isoniazida y del encapsulamiento.

A la Dra. Marguerite Rinaudo, Biomaterials Applications, 6, rue Lesdiguières, 38000 Grenoble (Francia), trabajo previo : Universidad de Joseph Fourier de Grenoble (Francia), por su apoyo en las lecturas RMN de las muestras de quitosano y orientación en el cálculo del grado de acetilación.

Al Dr. Daoning Zhang, Universidad de Maryland (EE.UU.), por su apoyo en las lecturas RMN de las muestras de Quitosano.

A la Dra. Aurica Chiriac, Instituto de Petru Poni de Química Macromolecular (Rumanía), por su apoyo en la determinación del peso molecular del poliaspartato de sodio por SLS.

Al Dr. Kevin Tucker, Universidad de Illinois (EE.UU.), por su apoyo en las lecturas ESI/MS de la isoniazida y del encapsulamiento.

A la Dra. Patricia Vásquez y a la Licenciada Romina Arreche, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA) - Argentina, por su apoyo en las lecturas SEM de las muestras del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico.

Al Dr. Armando Zaragoza, Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) - México, por su apoyo en las lecturas TEM y STEM de las soluciones coloidales y del encapsulamiento (sólido), respectivamente.

Al Dr. Joel Bumgardner y al aspirante al doctorado Gregory McGraw, Universidad de Memphis (EE.UU.), por su apoyo en las lecturas GPC de las muestras de quitosano.

Al Dr. Ricardo Alvarado y al Dr. José Vega, Laboratorio Nacional de Alta Tecnología (LANOTEC) - Costa Rica, por su apoyo en las lecturas AFM de las soluciones coloidales.

Al Dr. Roberto Gil, Universidad de Carnegie Mellon (EE.UU.), por su apoyo en las lecturas RMN del poliaspartato de sodio.

Al Dr. Alfredo Angeles-Boza, Universidad de Connecticut (EE.UU.), por su apoyo en la lectura RMN de la polisuccinimida.

Al Dr. Hans Pedersen, Universidad de Aarhus (Dinamarca), por su apoyo en el envío de artículos científicos y orientación en el tema de ESI/MS.

Al Dr. Robert Papoular, Laboratorio Leon Brillouin (Francia), por su orientación en el tema de DRX.

Al Dr. Jian-Feng Weng, Universidad de Ciencia y Tecnología en Shanghai (China), por su apoyo en el envío de artículos científicos.

A la Dra. Angélica Naka, Instituto Nacional de Estudios Ambientales (Japón), por su apoyo en el envío de artículos científicos.

Al Dr. Eric Simanek, Universidad Cristiana de Texas (EE.UU.), y al Dr. Susheng Tan, Universidad de Pittsburgh (EE.UU.), por su apoyo (intentos) en el análisis LC/MS del encapsulamiento y del análisis TEM de las soluciones coloidales, respectivamente.

Al Dr. Hugo Alarcón y al Dr. Alcides López, Universidad Nacional de Ingeniería, por su apoyo en las lecturas DLS de las soluciones coloidales.

A la Dra. Silvia Suarez, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en la ultracentrifugación de las muestras coloidales.

A la Profesora Dolores Rivera, Departamento de Analítica de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en el secado de las soluciones coloidales.

Al Dr. Leoncio Reyna, Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo en la liofilización de los complejos interpoliméricos quitosano-poliácido aspártico y de la muestra de poliaspartato de sodio.

Al Profesor Marco Guerrero, por haber brindado todas las facilidades de las instalaciones del Departamento de Química Orgánica para el desarrollo de la presente tesis.

A mis maestros de Pregrado de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por sus enseñanzas de Química, lucha y perseverancia.

A mis amigos de LIDQO por su amistad y el grato ambiente que siempre me brindaron durante el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	4
3.1. Tuberculosis.....	4
3.1.1. Epidemiología.....	5
3.1.2. Ciclo de patogénesis de la tuberculosis.....	7
3.1.3. Síntomas.....	8
3.1.4. Formas de TBC.....	8
3.1.5. Tratamiento de la tuberculosis.....	9
3.2. Isoniazida.....	10
3.3. Sistema de liberación de drogas.....	12
3.3.1. Nanotecnología en la liberación controlada de drogas en el tratamiento de la TBC.....	13
3.3.1.1. Tipos de nanopartículas.....	15
3.3.1.2. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.....	22
3.3.1.3. Interacción de las nanopartículas con los macrófagos.....	26
3.3.1.4. Rutas de administración de nanopartículas basadas en drogas para el tratamiento de la TBC.....	28
3.4. Caracterización de polímeros y nanopartículas poliméricas.....	29
3.4.1. Técnicas para determinar el peso molecular de polímeros.....	29
3.4.1.1. Dispersión de Luz Estática (SLS).....	29
3.4.1.2. Cromatografía de permeación por gel (GPC).....	31
3.4.1.3. Viscosimetría intrínseca o capilar.....	34
3.4.2. Técnicas para determinar el tamaño y la morfología de partículas.....	35
3.4.2.1. Microscopía por transmisión electrónica (TEM).....	35
3.4.2.2. Microscopía por transmisión electrónica por barrido (STEM).....	36
3.4.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
3.4.2.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	39
3.4.2.5. Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	40

3.4.2.6. Difracción de rayos X (DRX).....	43
3.4.2.7. Espectrometría de masas por Ionización Electrospray (ESI/MS).....	45
4. ANTECEDENTES.....	47
5. DISEÑO Y SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO- POLIÁCIDO ASPÁRTICO CONTENIENDO ISONIAZIDA.....	49
5.1. Diseño.....	49
5.2. Síntesis.....	55
5.2.1. Síntesis de la polisuccinimida (PSI).....	55
5.2.2. Síntesis del poliácido aspártico y su sal de sodio.....	56
5.2.3. Preparación de quitosanos de diferentes pesos moleculares.....	57
5.2.4. Síntesis del complejo interpolimérico quitosano-poliácido Aspártico.....	57
5.2.5. Síntesis de nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico conteniendo isoniazida.....	58
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	58
6.1. Equipos y Reactivos.....	58
6.2. Metodología.....	61
6.2.1. Quitosano.....	61
6.2.1.1. Obtención de quitosanos de diferente pesos moleculares.....	61
6.2.1.2. Grado de acetilación determinado por RMN- ¹ H	62
6.2.1.3. Peso molecular determinado por GPC.....	62
6.2.2. Polisuccinimida (PSI)	62
6.2.2.1. Síntesis.....	62
6.2.2.2. Peso molecular determinado por viscosimetría capilar.....	63
6.2.3. Poliácido aspártico (Síntesis).....	63
6.2.4. Poliaspartato de sodio.....	63
6.2.4.1. Síntesis.....	63
6.2.4.2. Determinación del Peso Molecular por SLS.....	64

6.2.5. Complejo interpolimérico de Quitosano - Políácido aspártico (Q-PAA).....	64
6.2.5.1. Solución Coloidal.....	64
6.2.5.2. Partículas sólidas (Secado a 40 °C).....	66
6.2.5.3. Liofilización.....	66
6.2.6. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico de Quitosano - Políácido aspártico (I/Q-PAA)	67
6.2.6.1. Solución coloidal.....	67
6.2.6.2. Partículas sólidas (Secado a 20 y 40 °C).....	68
6.2.7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de isoniazida, ácido isonicotínico y del encapsulamiento I/Q-PAA4s.....	70
6.2.8. Análisis UV-Visible.....	70
6.2.8.1. Isoniazida	70
6.2.8.2. Ácido isonicotínico.....	70
6.2.8.3. Complejo interpolimérico Quitosano - Políácido aspártico.....	70
6.2.8.4. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano - Políácido aspártico.....	70
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
7.1. Quitosano.....	71
7.1.1. Preparación.....	71
7.1.2. Rendimiento de los quitosanos obtenidos por hidrólisis ácida de los quitosanos Q1 y Q2.....	72
7.1.3. Caracterización.....	73
7.1.3.1. Espectroscopia Infrarroja.....	73
7.1.3.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	74
7.1.3.3. Grado de acetilación.....	76
7.1.3.4. Peso molecular determinado por GPC.....	86
7.1.3.5. Análisis SEM.....	90
7.1.3.6. Análisis DRX.....	91
7.2. Polisuccinimida.....	92
7.2.1. Síntesis.....	92
7.2.2. Caracterización.....	93
7.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja.....	93

7.2.2.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	94
7.2.2.3. Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar...	95
7.3. Poliacido aspártico.....	97
7.3.1. Síntesis.....	97
7.3.2. Caracterización (IR).....	98
7.4. Poliaspartato de sodio.....	99
7.4.1. Síntesis.....	99
7.4.2. Caracterización.....	99
7.4.2.1. Espectroscopia Infrarroja.....	99
7.4.2.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	100
7.4.2.3. Determinación del peso molecular por SLS.....	104
7.4.2.4. Análisis SEM.....	104
7.4.2.5. Análisis DRX.....	105
7.5. Complejo interpolimérico Quitosano - Poliacido aspártico.....	106
7.5.1. Solución coloidal.....	106
7.5.1.1. Síntesis.....	106
7.5.1.2. Caracterización (DLS, AFM, TEM).....	107
7.5.2. Partículas sólidas (Secado a 40 °C y liofilización).....	112
7.5.2.1. Secado a 40 °C (caracterización: IR, SEM, DRX).....	112
7.5.2.2. Liofilización (caracterización: IR, SEM).....	117
7.5.2.3. Comparación de las imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano - poliacido aspártico liofilizado y secado a 40 °C en placas petri.....	122
7.6. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano - Poliacido aspártico.....	123
7.6.1. Solución coloidal.....	123
7.6.1.1. Síntesis.....	123
7.6.1.2. Caracterización (DLS, AFM, TEM, STEM).....	124
7.6.2. Partículas sólidas.....	128
7.6.2.1. Caracterización (IR, DRX, SEM, STEM, ESI/MS).....	130
7.7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF).....	140
7.8. Análisis UV-Visible.....	144
7.8.1. Determinación de la longitud de onda de trabajo de la isoniazida en medio acuoso y ácido.....	144

7.8.2. Determinación de la longitud de onda del ácido isonicotínico en medio acuoso y ácido.....	146
7.8.3. UV-Visible del complejo interpolimérico quitosano – Poliacido aspártico, Q-PAA10s.....	148
7.8.4. UV-Visible de la isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano - Poliacido aspártico, I/Q-PAA4s.....	149
7.8.4.1. Identificación de isoniazida.....	149
7.8.4.2. Cuantificación de isoniazida	150
8. CONCLUSIONES.....	154
9. RECOMENDACIONES.....	157
10. BIBLIOGRAFÍA.....	158
11. ANEXOS.....	174

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

TBC	Tuberculosis
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
OMS	Organización Mundial de la Salud
MDR-TB	Multidrug Resistance Tuberculosis Tuberculosis resistente a drogas múltiples
MINSA	Ministerio de Salud
INH	Isoniazida
RIF	Rifampicina
PYZ	Pirazinamida
ETB	Etambutol
XDR-TB	Extremely Resistant Tuberculosis Tuberculosis extremadamente resistente
KatG	Catalasa-peroxidasa
inhA	enoil-acil reductasa
FAS I	Sintetasa I del ácido graso
FAS II	Sintetasa II del ácido graso
HPMA	Poly(<i>N</i> -2-hydroxypropyl)methacrylamide Poli(<i>N</i> -(2-hidroxilpropil)metacrilamida
PAMAM	Poly(amido amine) Poliamidoamina
PBCA	Polybutylcyanoacrylate Poli(n-butilcianoacrilato)
PIBCA	Poly(iso-butylcyanoacrylate) Polisobutilcianoacrilato
PLA	Polylactic acid Poliácido láctico
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid) Poliácido láctico-co-poliácido glicólico
PVA	Polyvinyl alcohol Polivinilalcohol
TPP	Triphosphosphate Tripolifosfato

PEG-PASP	Polyethyleneglycol-polyaspartic acid Polietilenglicol-poliácido aspártico
CMC	Concentración micelar crítica
ADN	Ácido dexosirribonucleico
SLNs	Solid Lipid Nanoparticles Nanopartículas sólidas de lípidos
SLS	Static Light Scattering Dispersión de Luz Estática
R_g	Radio de giro
A₂	Segundo coeficiente virial
I₀	Intensidad de la luz incidente
I_θ	Intensidad de la luz dispersada
R_θ	Proporción en exceso de Rayleigh
P_θ	Factor forma
GPC	Gel Permeation Chromatography Cromatografía de permeación por gel
LS	Light Scattering Dispersión de la luz
M_n	Peso molecular promedio en número
M_w	Peso molecular promedio en peso
M_v	Peso molecular obtenido por viscosidad
DIR	Diferencial de índice de refracción
TEM	Transmission Electron Microscopy Microscopía por transmisión electrónica
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy Microscopía por transmisión electrónica por barrido
SEM	Scanning Electron Microscopy Microscopía electrónica de barrido
AFM	Atomic Force Microscopy Microscopía de fuerza atómica
DLS	Dynamic Light Scattering Dispersión de Luz Dinámica
D	Coeficiente de difusión translacional
dH	Diámetro hidrodinámico o diámetro efectivo
η	Viscosidad intrínseca

DRX	Difracción de rayos X
C.I.	Crystallinity Index Índice de cristalinidad
D_{ap}	Tamaño del cristal aparente
ESI	Electrospray Ionization Ionización por Electrospray
MS	Mass Spectrometry Espectrometría de masas
Q-TOF	Quadrupole-Time-of-Flight Cuadrupolo - tiempo de vuelo
CCF	Cromatografía en capa fina
m/z	Relación masa-carga
PSI	Polisuccinimida
DMF	N,N-dimetilformamida
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
IR	Infrared Spectroscopy Espectroscopia infrarroja
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada
Q-PAA	Solución coloidal del complejo interpolimérico
I/Q-PAA	Solución coloidal del encapsulamiento
Q-PAA_s	Complejo interpolimérico secado a 40 °C
I/Q-PAA_s	Encapsulamiento secado a 20 °C
Q-PAA/L	Complejo interpolimérico liofilizado
SN1	Sustitución nucleofílica unimolecular
GA	Grado de acetilación

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Síntesis de soluciones coloidales del Q-PAA.....	65
Tabla 2. Diluciones de las soluciones coloidales del Q-PAA para el análisis DLS.....	66
Tabla 3. Síntesis de soluciones coloidales del Q-PAA para el proceso de liofilización.....	67
Tabla 4. Ensayos de encapsulamiento de I/Q-PAA.....	68
Tabla 5. Soluciones coloidales I/Q-PAA para su posterior secado a 20 y 40 °C.....	69
Tabla 6. Rendimiento de los quitosanos obtenidos por hidrólisis ácida de los quitosanos Q1 y Q2.....	72
Tabla 7. Grado de acetilación de las muestras de quitosano analizados por RMN- ¹ H en D ₂ O/DCl a 80 °C.....	77
Tabla 8. Grado de acetilación de las muestras de quitosano analizados por RMN- ¹ H en el buffer CD ₃ COONa/CD ₃ COOD a 80 °C.....	86
Tabla 9. Peso molecular determinado por GPC de las muestras de quitosano obtenidos de la hidrólisis ácida de Q1.....	88
Tabla 10. Peso molecular determinado por GPC de las muestras de quitosano Q2 y Q2-4.....	90
Tabla 11. Datos de la gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de polisuccinimida.....	96
Tabla 12. Diámetro efectivo promedio de las partículas de las soluciones coloidales sobrenadante diluidas de Q-PAA1-11 analizados por DLS.....	109

Tabla 13. Rendimiento de la síntesis del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico liofilizados.....	117
Tabla 14. Resultados DLS del diámetro efectivo de las partículas de Quitosano-Poliácido aspártico conteniendo Isoniazida.....	125
Tabla 15. Concentración de isoniazida en las muestras de encapsulamiento...	151
Tabla 16. Eficiencia de carga y encapsulamiento de la isoniazida en el encapsulamiento.....	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial indicando la incidencia de TBC (2008-2013).....	5
Figura 2. Tasa de mortalidad por Tuberculosis por trimestre en Perú.....	6
Figura 3. Ciclo de patogénesis (infección) de la tuberculosis.....	7
Figura 4. Estructura de la isoniazida.....	10
Figura 5. Mecanismo de acción de la isoniazida en el <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	11
Figura 6. Niveles de droga en la sangre con dosis vía ruta tradicional (a) y dosis con liberación controlada (b).....	13
Figura 7. Clasificación de las nanopartículas.....	14
Figura 8. Estructura de los polímeros.....	16
Figura 9. Dendrímeros.....	18
Figura 10. Micelas.....	19
Figura 11. Liposomas.....	20
Figura 12. Niosomas.....	21
Figura 13. Posible mecanismo por el cual la droga encapsulada en la nanopartícula es liberada en el macrófago infectado para el tratamiento de la TBC.....	27
Figura 14. Principio de Dispersión de Luz Estática (SLS).....	30
Figura 15. Exclusión de las moléculas por tamaño en la columna GPC.....	33
Figura 16. Cromatograma GPC: Diferencial del índice de refracción versus tiempo y peso molecular.....	33

Figura 17. Viscosímetro Ubbelohde.....	34
Figura 18. Interacciones entre electrones y el material.....	35
Figura 19. Diagrama del Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM).....	36
Figura 20. Diagrama del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).....	37
Figura 21. Interacción de los electrones con el material y detección de los electrones secundarios.....	38
Figura 22. Principio del análisis de Microscopía de Fuerza atómica (AFM).....	39
Figura 23. Ploteo de la Fuerza en función de la separación sonda-muestra....	40
Figura 24. Principio del análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	41
Figura 25. Distribución del tamaño monodisperso y polidisperso.....	43
Figura 26. Principio de difracción.....	43
Figura 27. Componentes básicos del espectrómetro ESI/MS.....	46
Figura 28. Representación esquemática de la fuente de iones ESI.....	46
Figura 29. Complejo interpolimérico quitosano - poliácido aspártico (a) e interacción iónica entre quitosano y poliácido aspártico.....	50
Figura 30. Estructura del Quitosano.....	51
Figura 31. Estructura del α -quitosano (a) y β -quitosano (b).....	52
Figura 32. Estructura del α,β -poli(DL-ácido aspártico).....	54
Figura 33. Síntesis de la polisuccinimida (PSI).....	56
Figura 34. Síntesis del Poliaspartato de sodio.....	57

Figura 35. Esquema de la formación de nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico.....	58
Figura 36. Posible mecanismo para la hidrólisis ácida del enlace glucosídico del quitosano.....	71
Figura 37. Espectro IR (ATR) del Quitosano (Q2-4).....	74
Figura 38. Espectro RMN- ¹ H del Quitosano (Q2) en D ₂ O/DCl a 80 °C.....	75
Figura 39. Espectro RMN- ¹ H del Quitosano (Q1-1) en CD ₃ COONa/CD ₃ COOD a 80 °C.....	76
Figura 40. Espectros RMN- ¹ H en D ₂ O/DCl a 80 °C de Q1-0 (a), Q1-1 (b), Q1-2 (c), Q1-3 (d) y Q1-4 (e).....	80
Figura 41. Espectros RMN- ¹ H en D ₂ O/DCl a 80 °C de Q2 (a) y Q2-4 (b).....	81
Figura 42. Espectros RMN- ¹ H superpuestos en D ₂ O/DCl a 80 °C de las muestras de Quitosano.....	82
Figura 43. Ampliación de la señal del protón metilo del grupo acetilo en el espectro RMN- ¹ H en D ₂ O/DCl a 80 °C de las muestras de quitosano.....	83
Figura 44. Espectros RMN- ¹ H en el buffer CD ₃ COONa/CD ₃ COOD a 80 °C de Q1-1 (a), Q1-2 (b) y de Q2-4 (c).....	85
Figura 45. Cromatogramas GPC en función del índice de refracción (gráfica azul) y de la luz dispersada (gráfica roja) de los quitosanos obtenidos de la hidrólisis ácida con CH ₃ COOH 1 % v/v de Q1-0 (a), Q1-1 (b), Q1-2 (c), Q1-3 (d), Q1-4 (e), Q2 (f) y Q2-4 (g).....	87
Figura 46. Imágenes SEM del quitosano (Q2-4) a dos magnificaciones: 80 (a) y 250X (b).....	91

Figura 47. Difractograma de rayos X del quitosano (Q2-4).....	92
Figura 48. Mecanismo de reacción de la síntesis de la polisuccinimida.....	93
Figura 49. Espectro IR (ATR) de la polisuccinimida.....	94
Figura 50. Espectro RMN- ¹ H en DMSO- <i>d</i> ₆ de la polisuccinimida.....	95
Figura 51. Gráfica de la viscosidad reducida versus la concentración de la polisuccinimida.....	96
Figura 52. Mecanismo de reacción de la síntesis del poliácido aspártico.....	97
Figura 53. Espectro IR (ATR) del poliácido aspártico.....	99
Figura 54. Espectro IR (ATR) del poliaspartato.....	100
Figura 55. Espectro RMN- ¹ H en D ₂ O del Poliaspartato.....	101
Figura 56. % de unidades β y α del poliaspartato determinado por RMN- ¹ H en D ₂ O.....	102
Figura 57. Espectro RMN- ¹³ C en D ₂ O del poliaspartato : escala 0 a 200 ppm (a), escala 35 a 55 ppm (b) y escala 170 a 180 ppm (c)...	103
Figura 58. Gráfica Debye Plot de Concentración versus Intensidad y KC/RoP.	104
Figura 59. Imágenes SEM del poliaspartato a diferentes magnificaciones: 200 (a), 500 (b) y 1000X(c).....	105
Figura 60. Difractograma de rayos X del poliaspartato.....	106
Figura 61. Efecto Tyndall de la solución coloidal Q-PAA.....	106
Figura 62. Estructuras del poliácido aspártico y del poliácido glutámico.....	107
Figura 63. Distribución del tamaño de las partículas de la solución coloidal sobrenadante diluida de Q-PAA1, analizado por DLS.....	108

Figura 64. Imagen AFM de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10.....	111
Figura 65. Imágenes TEM de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10 a dos magnificaciones a) y b) 50000 y c) 15000X.....	112
Figura 66. Espectro IR (KBr) de Q-PAA10s	113
Figura 67. Imágenes SEM comparativo de Q-PAA10s, a dos magnificaciones 80 (a) y 500X (b) con Q2-4 a una magnificación de 80X (c) y con el Poliaspartato a una magnificación de 500X (d).....	114
Figura 68. Difractograma de rayos X de Q-PAA10s, Q2-4 y poliaspartato.....	115
Figura 69. Difractograma de rayos X del α -quitosano.....	116
Figura 70. Resuspensión en agua de Q-PAA10s (1,9 mg en 1,5 mL de agua).	116
Figura 71. Comparación de los espectros IR (ATR) del poliaspartato (a), Q-PAA/L5 (b) y Q1-4 (c).....	118
Figura 72. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 300X.....	120
Figura 73. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 2500X.....	121
Figura 74. Comparación de las imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado (Q-PAA/L5) y secado a 40 °C en placas petri.....	123
Figura 75. Comparación de las imágenes AFM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico (Q-PAA10) (a), I/Q-PAA2 (b); I/Q-PAA3 (c) y I/Q-PAA4 (d).....	126
Figura 76. Imágenes TEM de solución coloidal sobrenadante de I/Q-PAA4 a diferentes magnificaciones : (a) 38000, (b) 50000, (c) 27500, (d) 66000, (e), (f) y (g) 150000X.....	127

Figura 77. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico secadas en placas petri a 20 °C (a) y 40 °C (b)	128
Figura 78. Partículas sólidas de isoniazida encapsulada en el complejo Interpolimérico quitosano-poliácido aspártico (I/Q-PAA) secadas a 20 °C (a) y 40 °C (b).....	129
Figura 79. Degradación de la isoniazida por hidrólisis ácida y calor.....	129
Figura 80. Comparación de los espectros IR (KBr) de la droga libre Isoniazida (a), del encapsulamiento I/Q-PAA4s (b) y del complejo interpolimérico Q-PAA10s (c).....	131
Figura 81. Difractograma de rayos X de la isoniazida libre (a), del encapsulamiento I/Q-PAA4s (b) y del complejo interpolimérico Q-PAA10s (c).....	133
Figura 82. Comparación de las imágenes SEM de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/Q-PAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s a una magnificación de 80X.....	135
Figura 83. Resuspensión en agua del encapsulamiento I/Q-PAA4s (1,9 mg en 1,5 mL de agua).....	136
Figura 84. Imágenes STEM del encapsulamiento I/Q-PAA4s, resuspendido en etanol (a) y en agua (b).....	137
Figura 85. Espectro ESI/MS de la isoniazida en agua.....	138
Figura 86. Espectro ESI/MS de la isoniazida en medio ácido (HCl 1 M).....	138
Figura 87. Fragmentación de la isoniazida.....	139
Figura 88. Espectro ESI/MS del encapsulamiento I/Q-PAA4s en medio ácido (HCl 1 M).....	140

Figura 89. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y de la isoniazida (b) en medio acuoso.....	140
Figura 90. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y la isoniazida (b) en medio ácido (HCl 0,1 M; pH = 1-2, una hora de exposición).....	141
Figura 91. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y la isoniazida (b) en medio ácido (CH ₃ COOH 1 %; pH = 4, una hora y dos semanas de exposición).....	142
Figura 92. Imagen de la cromatografía en capa fina del encapsulamiento I/Q-PAA4s (a) y la isoniazida (b), en medio ácido (HCl 0,1 M).....	143
Figura 93. Protonación de la isoniazida en medio ácido : protonación del nitrógeno del anillo piridina (a) y protonación del nitrógeno del grupo -NH ₂ (b).....	144
Figura 94. Espectro UV- Visible de la solución acuosa de isoniazida 0,1 mM...	145
Figura 95. Espectro UV-Visible de la isoniazida 0,1 mM en HCl 0,1 M.....	145
Figura 96. Espectro UV - Visible de la solución acuosa del ácido isonicotínico 0,1 mM.....	146
Figura 97. Espectro UV-Visible del ácido isonicotínico 0,1 mM en HCl 0,1 M...	147
Figura 98. Protonación del nitrógeno del anillo piridina del ácido isonicotínico.	148
Figura 99. Espectro UV - Visible del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico Q-PAA10s en HCl 0,1 M.....	149
Figura 100. Espectro UV-Visible para la identificación de la isoniazida en el encapsulamiento I/Q-PAA4s (secado a 20 °C)	150
Figura 101. Curva de calibración de concentración de isoniazida (mM) en HCl 0,1 M versus absorbancia.....	150

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico.....	175
Anexo 2. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico preparada con el orden inverso de la adición de los reactivos.....	180
Anexo 3. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico Q-PAA10 resuspendido en agua.....	181
Anexo 4. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 150, 500 y 1000X.....	182
Anexo 5. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado y secado a 40 °C en placas petri a las magnificaciones de 100 y 150X, respectivamente.....	185
Anexo 6. Distribución del tamaño de nanopartículas por DLS de Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico.....	186
Anexo 7. Imágenes SEM de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/QPAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s a las magnificaciones de 100, 200, 250, 500, 700, 800 y 2000X.....	188
Anexo 8. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del encapsulamiento I/QPAA4s resuspendido en agua.....	192
Anexo 9. Espectro RMN- ¹ H del Ácido Isonicotínico en DMSO- <i>d</i> ₆	193

1. RESUMEN

La presente tesis se basa en la síntesis y caracterización de nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico conteniendo isoniazida. El complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico posee características apropiadas para cumplir el rol de vehículo polimérico de la droga antituberculosa isoniazida. Es biodegradable, biocompatible, no tóxico y posee grupos funcionales capaces de interactuar con la droga mediante enlaces puentes de hidrógeno entre los grupos N-H y O-H.

La polisuccinimida (PSI) fue sintetizada por policondensación térmica del monómero DL-ácido aspártico, catalizada por ácido fosfórico. El poliácido aspártico fue sintetizado a partir de la hidrólisis básica del PSI. Estos polímeros fueron caracterizados por Espectroscopia Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Difracción de Rayos X (DRX). Los pesos moleculares del PSI y del poliácido aspártico fueron determinados por Viscosimetría Capilar y Dispersión de Luz Estática (SLS), respectivamente.

Quitosanos, extraídos de la pota (*Dosidicus gigas*), de diferentes pesos moleculares, fueron obtenidos por hidrólisis ácida y fueron caracterizados por IR, RMN, DRX, SEM y GPC (Cromatografía de Permeación por Gel).

Las nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico y del encapsulamiento en solución coloidal fueron sintetizadas empleando la técnica de gelación ionotrópica, siendo las condiciones de síntesis agitación por una hora y a temperatura ambiente donde la solución del poliaspartato fue agregada sobre la solución del quitosano. La caracterización fue realizada por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Las muestras sólidas obtenidas de las soluciones coloidales mencionadas anteriormente fueron obtenidas al secar dichas soluciones en placas petri a 20 °C (encapsulamiento) y 40 °C (complejo interpolimérico). La caracterización de los sólidos fue realizada por IR, DRX, Microscopía de Transmisión Electrónica por Barrido (STEM), SEM, cromatografía en capa fina (CCF) y Espectrometría de Masas por Ionización Electrospray (ESI/MS).

La identificación y cuantificación, % de Eficiencia de Encapsulamiento y Carga, de isoniazida en el encapsulamiento sintetizado fue realizado mediante la técnica de Espectroscopia UV-Visible.

La polisuccinimida y el poliaspartato de sodio poseen un peso molecular de 18,2 kDa y 8,11 kDa, respectivamente. Asimismo, los pesos moleculares de los quitosanos empleados en este trabajo se encuentran en el rango de 10^5 - 10^6 Da. Por otro lado, el grado de acetilación (GA) de la primera y segunda muestra de quitosano de alto peso molecular, determinado por RMN- ^1H , es 4 – 5 % y 14 %, respectivamente.

El análisis TEM de la solución coloidal del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico y del encapsulamiento muestra el tamaño nano de las partículas, 60 - 209 nm y 25 - 134 nm, respectivamente. Asimismo, los análisis TEM y AFM muestran que el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico posee una morfología casi esférica, mientras que el encapsulamiento posee dos tipos de morfología, esférica y alargada.

El análisis DLS de la solución coloidal del encapsulamiento con la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 demuestra que el tamaño de las partículas es $148,5 \pm 1$ nm, cuyo resultado no presenta mucha variación respecto al tamaño del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, el cual es $142,1 \pm 2,9$ nm.

En el espectro ESI/MS del encapsulamiento se observa el pico 138 m/z perteneciente, posiblemente, al aducto $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la isoniazida.

El análisis STEM del encapsulamiento, en estado sólido, demuestra que el tamaño de las partículas se encuentra en el rango nano de 100 a 300 nm.

Las imágenes SEM del complejo interpolimérico y del encapsulamiento, en estado sólido, demuestran que el primero posee una morfología de granos con superficie rugosa y láminas corrugadas con superficie lisa, mientras que el encapsulamiento posee una morfología de granos con una región rica de filamentos largos y uniformes.

De acuerdo al análisis SEM el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado posee una morfología más compacta y dura que el complejo interpolimérico secado a 40 °C en placas petri.

El análisis UV-Visible demuestra que efectivamente la isoniazida se encuentra presente en el encapsulamiento. Siendo el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento y eficiencia de carga, para el encapsulamiento con la relación isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1, de 5,30 - 5,81 % y 1,61-1,77 %, respectivamente.

2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que aflige a la humanidad por ciento de años, representando actualmente un problema serio para la salud pública en muchas partes del mundo, especialmente en los países pobres. Asimismo, el tratamiento actual de la TBC, la cual involucra la administración oral de las drogas isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida¹, es complejo debido a la toxicidad de las drogas y al corto tiempo de vida de estas moléculas en la circulación sistémica y está llegando a ser mucho más complejo debido a la resistencia que muestra la bacteria hacia estas drogas como consecuencia de las mutaciones del gen. Además, el tratamiento de la TBC se ve complicado cuando el paciente sufre de infección VIH.²

Por lo tanto, el desarrollo de sistemas de liberación de drogas es fundamental para mejorar el tratamiento establecido, siendo, las principales ventajas proveer rutas de administración más efectivas, liberar la droga a una velocidad sostenida disminuyendo la frecuencia de dosis, prolongar el tiempo de vida de la droga en la circulación sistémica reduciendo la inmunogenicidad, liberar la droga en lugares específicos para minimizar efectos secundarios, mejorar la solubilidad de las drogas hidrofóbicas, liberar dos a más drogas simultáneamente para generar efectos sinérgicos y suprimir la resistencia a la droga; y por último reducir los costos del tratamiento.³

En la liberación sostenida y controlada de drogas juega un rol importante el desarrollo de nanopartículas empleando materiales biodegradables, biocompatibles y no tóxicos como los polímeros, mejorando de esta manera la farmacocinética y la biodistribución del agente activo lo cual depende de las propiedades fisicoquímicas y/o de las propiedades de degradación de los vehículos poliméricos.¹

La presente tesis se basa en la síntesis de nanopartículas de un complejo interpolimérico no tóxico, biodegradable y biocompatible conteniendo isoniazida, una de las drogas más comúnmente usadas de la primera línea del tratamiento de la TBC, donde el complejo interpolimérico actuará como vehículo o transportador de la droga.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TBC) es una infección persistente altamente contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual afecta usualmente a los pulmones, y posee la tasa de mortalidad más alta que cualquier otra enfermedad infecciosa de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS).^{4,5,6} La presencia de condiciones inmunosupresoras como diabetes, alcoholismo, mal nutrición, enfermedad crónica del pulmón y VIH/SIDA puede incrementar la infección por TBC.²

3.1.1. Epidemiología

En el mundo, en el 2013, existieron 9 millones de casos incidentes de TBC y 1,5 millones de personas mueren por esta enfermedad cada año, donde 1,1 millones de muertes son de personas con VIH-negativo y 0,4 millones de muertes de personas con VIH-positivo. Entre ellos se estima que 210000 muertes pertenecieron a personas con TBC resistente a drogas múltiples (MDR-TB) (OMS, 2014).⁶

El Sur Este de Asia y las regiones del Pacífico Oeste tuvieron el 56 % de casos de TBC en el 2013. La región de África tuvo aproximadamente un cuarto de los casos del mundo y las tasas más altas de casos y muertes (280 casos incidentes por 100000 personas en promedio). La India y China tuvieron el número más grande de los casos de TBC (24 % y 11 % del total global, respectivamente). Por otro lado, África del Sur, Lesoto y Swazilandia tuvieron, en el 2013, la tasa de incidencia más alta per cápita (un nuevo caso por cada 100 personas cada año) (OMS, 2014). En la Figura 1 se observa los 96 países con 89 % de casos estimados de TBC entre 2008-2014.⁶

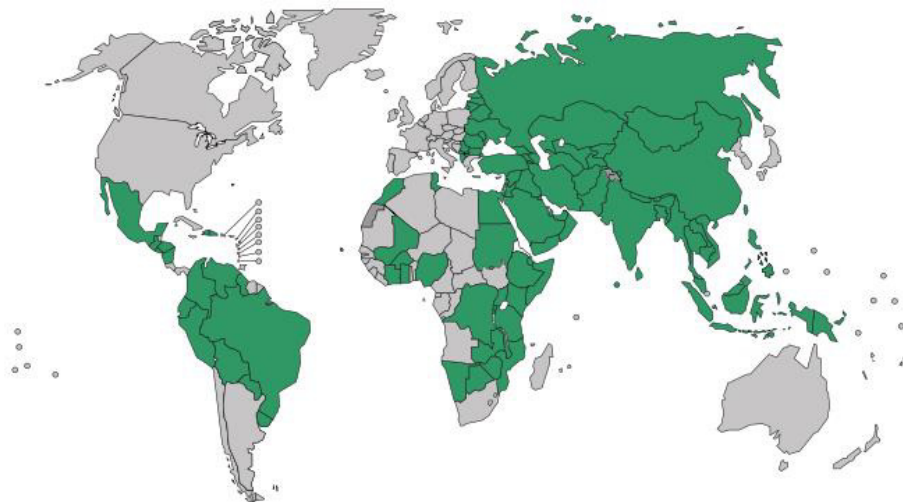


Figura 1. Mapa mundial indicando la incidencia de TBC (2008-2014).⁶

Referente a la Figura 1, en el 2013, el alto número estimado de los casos de TBC ocurrió en Asia (56 %) y en la región Africana (29 %), mientras que las proporciones más pequeñas de los casos de TBC ocurrió en la Región del Mediterráneo Este (8 %), en la Región Europea (4 %) y en la Región de América (3 %).⁶

En el Perú, de acuerdo al Ministerio de Salud (MINSA), el 60 % de los casos de TBC se concentran en Lima y Callao. Por otro lado, en el interior del país las regiones con mayor tasa de incidencia de TBC son: Madre de Dios, Ucayali, Tacna, Loreto e Ica. En la Figura 2 se observa la tasa de mortalidad por tuberculosis por trimestre.⁷

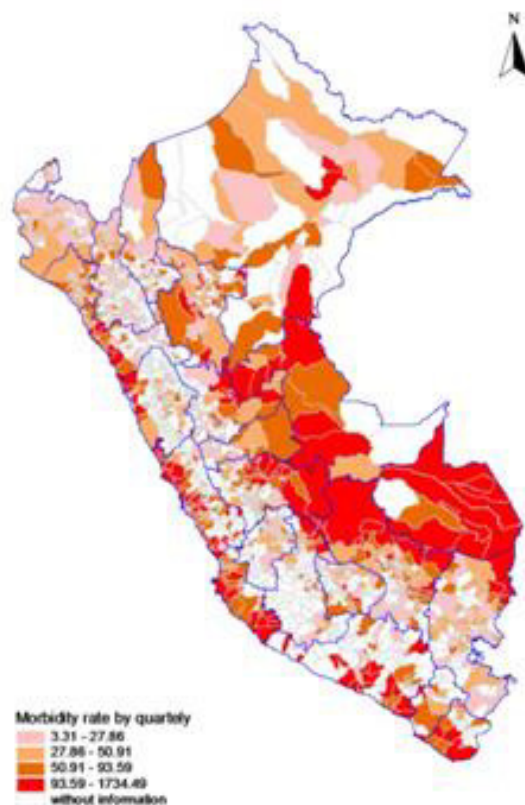


Figura 2. Tasa de mortalidad por Tuberculosis por trimestre en Perú.⁷

La tuberculosis es un serio problema de salud pública en el país, agravada por la presencia de la comorbilidad TBC-VIH SIDA y la TBC resistente a multidroga (MDR-TB). Asimismo, por cada hora 3 a 4 personas se enferman con TBC, reportándose al día 81 casos. Además, al día se reportan más de 3 muertes por TBC, notificándose al año 907 muertes siendo la principal causa la comorbilidad TBC-VIH. Por ejemplo, en el 2009, se han notificado 775 enfermos con TBC-VIH SIDA.⁷

La tuberculosis es una enfermedad social totalmente curable que afecta a la población económicamente activa, siendo los grupos de edad (entre los 15 y 54 años) los más afectados, resaltando que los adolescentes y adultos mayores constituyen alrededor de la tercera parte del total de casos.⁷

3.1.2. Ciclo de patogénesis de la tuberculosis

La tuberculosis se presenta principalmente en los pulmones pero puede desarrollarse como tuberculosis extrapulmonar, por ejemplo en el sistema circulatorio y en el sistema nervioso central o en cualquier parte del cuerpo.² En la Figura 3 se observa el ciclo de patogénesis de la tuberculosis.

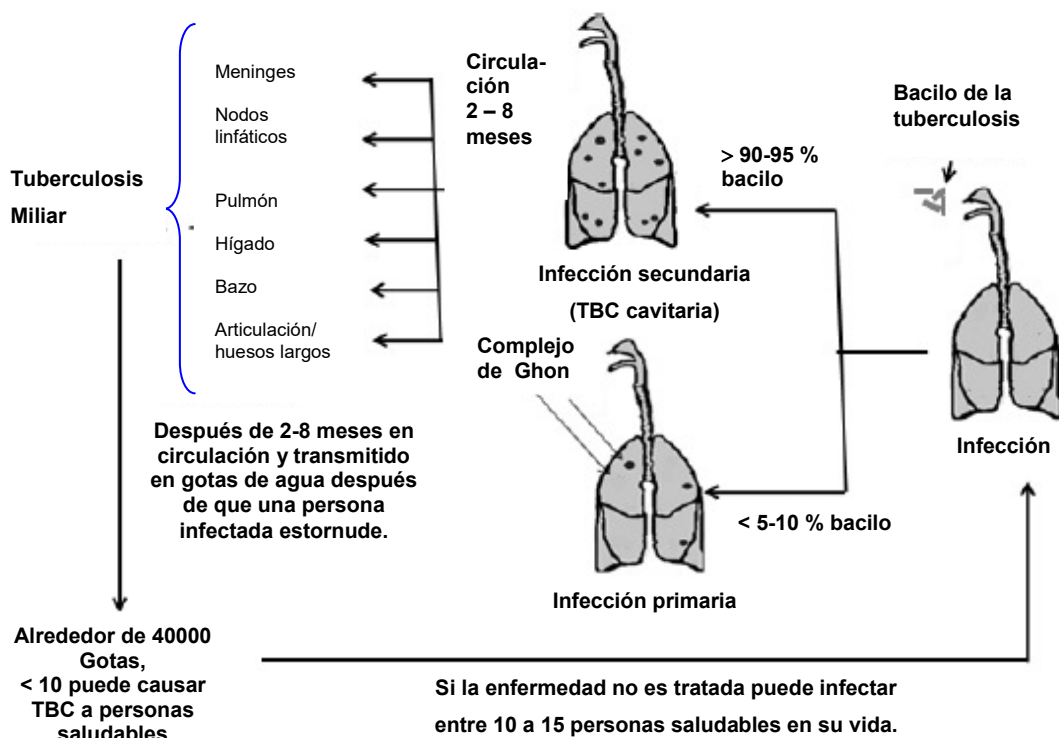


Figura 3. Ciclo de patogénesis (infección) de la tuberculosis. *Adaptada de la referencia 2*

En la Figura 3, se observa que la infección por TBC puede ocurrir como infección primaria que corresponde a un porcentaje de bacilos menor de 5-10 % originando el complejo de Ghon (lesión pulmonar causada en la tuberculosis que consiste en un foco de calcificación conjuntamente con una infección de los ganglios linfáticos) ó puede ocurrir con un porcentaje de bacilos mayor a 90-95 % originando la tuberculosis

cavitaria (infecta a los lóbulos superiores del pulmón y los destruye lentamente formando cavidades o espacios grandes de aire, con alta concentración de oxígeno, donde se desarrolla el *Mycobacterium tuberculosis*). Esta última infección, después de 2 a 8 meses de circulación, puede causar una infección generalizada en la meninge, nodo linfático, hígado, bazo, articulaciones, huesos largos (denominado TBC Miliar, la cual consiste en una infección crónica del *Mycobacterium tuberculosis* que se ha diseminado a través de otros órganos vía hematológica o linfática).²

3.1.3. Síntomas

La TBC latente, en la infección primaria, es usualmente asintomática pero puede producir síntomas no específicos como fatiga, debilidad, anorexia, pérdida de peso, sudor nocturno y fiebre de bajo grado. Cuando la enfermedad se reactiva los síntomas incluyen tos que produce esputo mucopurulento, dolor de pecho y hemoptisis ocasional (estupo de sangre). Por otro lado, la TBC activa presenta síntomas tempranos como tos, fiebre por la tarde, pérdida de peso, estupo manchado con sangre y sudor nocturno.⁸

3.1.4. Formas de TBC

Las dos formas de TBC son la TBC latente y la TBC activa. Con la TBC latente, la bacteria está inactiva en el cuerpo. Esta fase puede durar por un tiempo largo, incluso por décadas y es usualmente tratado tomando una medicina por nueve meses. En la TBC activa, la bacteria se multiplica y se expande en el cuerpo, causando daño a los tejidos.⁸

La TBC resistente a drogas múltiples (MDR-TB) es una forma de TBC en que la bacteria llega a ser resistente, al menos, a las 2 primeras líneas de drogas como isoniazida (INH) y rifampicina (RIF). El MDR-TB ocurre cuando el paciente no toma los antibióticos completos permitiendo que la bacteria mute y desarrolle resistencia a las drogas. Algunos pacientes con MDR-TB contraen esta enfermedad de otra persona con MDR-TB.⁸

Asimismo, la TBC extremadamente resistente a drogas (XDR-TB) es una forma más agresiva de MDR-TB en donde la bacteria es resistente a la primera línea de drogas como isoniazida y rifampicina; a cualquier fluoroquinona y al menos a una droga inyectable. Así como la MDR-TB, la XDR-TB puede ser transmitida o desarrollada. Sin

embargo, las opciones de tratamiento son menores y menos efectivas con muchos efectos no agradables.⁸

3.1.5. Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento de la TBC activa es complejo y está llegando a ser mucho más complejo con la emergencia de la tuberculosis resistente a drogas múltiples (MDR-TB) y a la infección VIH. El tratamiento actual de la TBC involucra la administración diaria de 4 antibióticos orales por un periodo de seis a más meses.²

La primera línea de drogas usadas en el tratamiento de TBC son isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PYZ) y etambutol (ETB) y estreptomicina. Estas drogas son administradas oralmente y poseen excelente potencia contra el *Mycobacterium tuberculosis*. La segunda línea de drogas usadas para el tratamiento de TBC son aminoglicosidos tales como amikacina (AMK) y kanamicina (KM), polipéptidos tales como capreomicina, viomicina, enviomicina, fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina (CIP), levofloxacina, moxifloxacina (MXF), tioamidas tales como etionamida, protioamida y cicloserina. La tercera línea de drogas para el tratamiento de la TBC incluye rifabutina, linezolid (LZD), tioidazina, arginina, vitamina D, macrolidos tales como claritromicina (CLR) y tioacetazona (T).⁸

La segunda línea de drogas tiene mayores efectos tóxicos que la primera línea (por ejemplo cicloserina) y son difíciles de encontrarse en países en desarrollo (por ejemplo fluoroquinolonas) o son menos efectivas que la primera línea de drogas (ejemplo ácido *p*-aminosalicílico). Por otro lado, la primera línea de drogas puede causar hepatitis, náuseas, sordera y una pérdida progresiva de la visión. Con respecto a la eficacia de las drogas de la tercera línea aún no ha sido probada.⁹

El actual régimen estándar del tratamiento de la primera línea de acuerdo al programa de control de tuberculosis de África del Sur del 2004 consiste en una fase inicial (intensiva) de dos meses de 4 drogas isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol donde estreptomicina es agregada al régimen cuando la persona es nuevamente tratada por TBC. Luego, la siguiente fase consiste en 4 meses con isoniazida y rifampicina para la completa eliminación del *Mycobacterium tuberculosis*.⁹

Muchas de las quimioterapias estándar no son efectivas para personas que tienen MDR-TB y prácticamente no existe cura para XDR-TB. Los patógenos micobacteriales

resistentes a las drogas son detectados en personas quienes han sido tratadas previamente por TBC siendo una posible causa el fracaso para completar el tratamiento muy largo, llegando los patógenos a ser resistentes especialmente para las dos drogas de la primera línea INH y RIF a través de mutaciones.⁹

Con el objetivo de mejorar el tratamiento por TBC se tiene que descubrir nuevas quimioterapias efectivas contra *Mycobacterium tuberculosis* o mejorar el potencial de las drogas ya existentes para tratar al MDR-TB.⁹

3.2. Isoniazida

Isoniazida (hidracida de ácido isonicotínico, INH, PM = 137,14 g/mol) ha sido la droga más común usada para el tratamiento de la tuberculosis desde que su actividad clínica fue reconocida en 1952 por Robitzek y Selikoff.¹⁰

La isoniazida consiste de un anillo de piridina y de un grupo hidracida (Figura 4), siendo un análogo de la nicotinamida. Asimismo, estructuralmente es similar a las drogas antituberculosas etionamida y pirazinamida.¹⁰

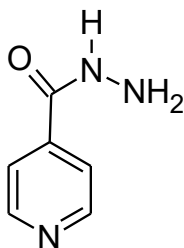


Figura 4. Estructura de la isoniazida

La isoniazida presenta una significativa actividad bactericida y debido a ello ha llegado a ser un componente crítico de la primera línea del régimen de antituberculosis. A pesar que en las dos últimas décadas la resistencia a la INH por el *Mycobacterium tuberculosis* ha sido reportada con una frecuencia incrementada.¹⁰

Mecanismo de acción

La isoniazida (INH), interfiere con la biosíntesis de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*. El mecanismo de acción (Figura 5) se inicia cuando la isoniazida penetra rápidamente a las células huésped de *Mycobacterium tuberculosis* por difusión a través de la membrana plasmática de la bacteria. Luego, la INH, la cual es una pro-

droga, es convertida a su forma activa por la hemoproteína catalasa-peroxidasa (KatG). La INH activada inhibe la acción de la proteína transportadora enoil-acil reductasa (inhA), siendo la inhA un importante componente del complejo sintetasa II del ácido graso (FAS II) y este, a su vez, participa en la síntesis de cadenas largas de ácido micólico. Siendo, los ácidos micólicos componentes estructurales esenciales de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*, los cuales se encuentran enlazados a la capa del arabinogalactano (polisacárido formado por los monosacáridos arabinosa y galactosa).^{10, 11, 12}

Por otro lado, cabe mencionar que el sistema FAS-I (complejo sintetasa I del ácido graso) en *Mycobacterium tuberculosis* lleva a cabo la síntesis *de novo* de ácidos grasos y genera precursores de 14-26 carbonos.¹³ Asimismo, las proteínas Emb (EmbA y EmbB) son arabinosiltransferasas micobacterianas involucradas en la biogénesis de la pared celular micobacteriana. Estos genes EmbA y EmbB trabajan unidas como un heterodímero involucradas en la formación del terminal hexaarabinosido del polisacárido arabinogalactano de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁴

Finalmente, el mecanismo preciso por el cual la INH destruye al *Mycobacterium tuberculosis* aún permanece en estudio.¹⁰

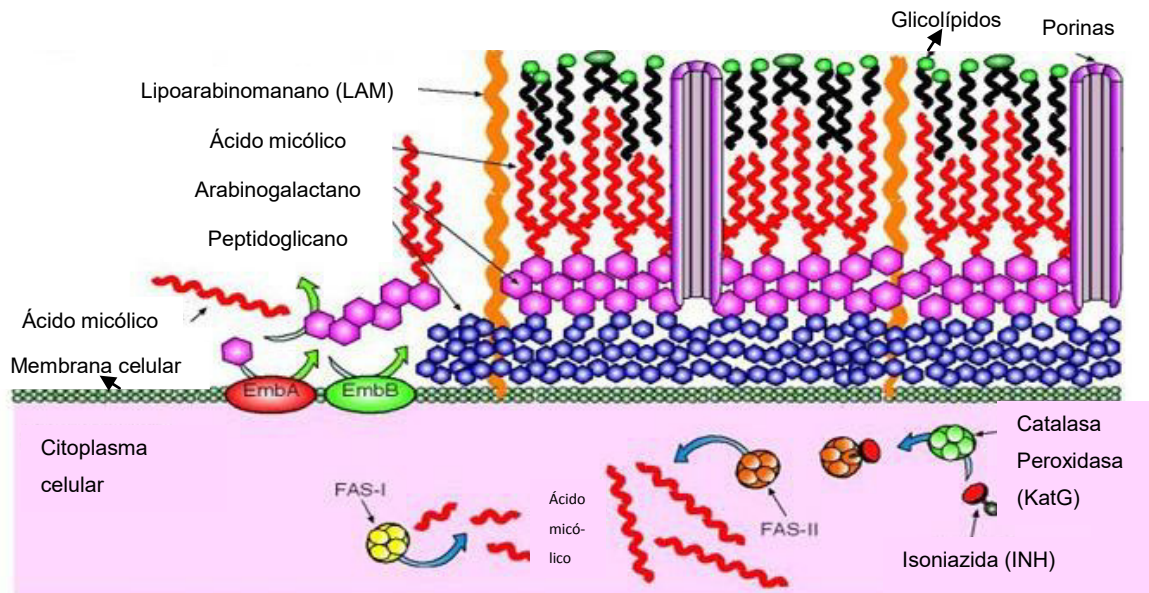


Figura 5. Mecanismo de acción de la isoniazida en el *Mycobacterium tuberculosis*.

Adaptada de la referencia 13

3.3. Sistema de liberación de drogas

El sistema de liberación de drogas ha tomado un gran interés para liberar drogas en el tratamiento de diversas enfermedades. Para ello, se necesita un transportador idóneo para liberar una adecuada y suficiente cantidad de droga al sitio objetivo, por lo tanto, varios tipos de formulaciones están siendo desarrolladas constantemente.¹⁵ Estas formulaciones tendrán éxito si el material (vehículo) es no tóxico, biocompatible, biodegradable y está libre de impurezas. Además debe tener una apropiada estructura física y debe ser rápidamente procesable.¹⁶

Por otro lado, muchos sistemas de liberación controlada de drogas logran un alto contenido de droga en la sangre por un periodo de tiempo prolongado, mientras que, con el empleo de tabletas o inyecciones, el nivel de la droga en la sangre sigue el perfil de la Figura 6-a el cual muestra que el nivel de la droga incrementa después de cada administración y luego decrece hasta la próxima administración. Además, a partir de esta administración oral tradicional el nivel de la droga en la sangre permanece entre un valor máximo el cual representa un nivel tóxico y un valor mínimo debajo del cual la droga no es efectiva. Por otro lado, en el sistema de liberación controlada de drogas diseñado para una administración de largo periodo, el nivel de la droga en la sangre sigue el perfil de la Figura 6-b, el cual permanece constante, entre el máximo y mínimo deseado, por un periodo de tiempo extendido. Además, dependiendo de la formulación y la aplicación, este tiempo puede ser de 24 horas, de un mes y 5 años.¹⁶

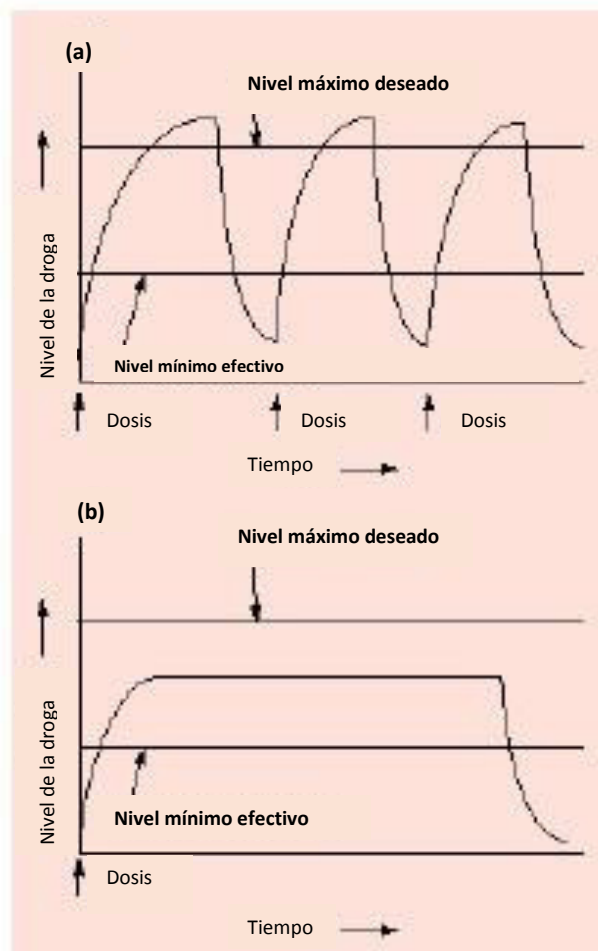


Figura 6. Niveles de droga en la sangre con dosis vía ruta tradicional (a) y dosis con liberación controlada (b). *Adaptada de la referencia 16*

3.3.1 Nanotecnología en la liberación controlada de drogas en el tratamiento de la TBC

Las nanopartículas tuvieron su origen alrededor de 1970 y son definidas como partículas sólidas coloidales, en el rango de 1-100 nm.^{3,15} Las nanopartículas fueron inicialmente empleadas en el sistema de liberación de drogas para vacunas y drogas anticáncer. Además, su uso también fue investigado en la liberación de drogas por administración ocular y oral.¹⁵

El sistema de liberación de drogas basadas en nanopartículas tiene considerable potencial para el tratamiento de tuberculosis. Las ventajas tecnológicas importantes de las nanopartículas usadas como transportadores de drogas son su alta estabilidad,

alta capacidad de carreo, viabilidad para incorporar drogas hidrofóbicas e hidrofílicas y viabilidad de varias rutas de administración entre ellas la aplicación oral e inhalación.¹⁷

Las nanopartículas permiten la liberación controlada de la droga, mejora de la biodisponibilidad de la droga, reducción de la frecuencia de la dosis, reducción de toxicidad y puede resolver el problema de no adherencia a la terapia prescrita el cual es uno de los mayores obstáculos en el control de la tuberculosis.¹⁷

Por otro lado, las nanopartículas se clasifican en nanocapsulas en el cual la droga es adsorbida, disuelta o dispersada homogéneamente a través de la matriz y en nanocapsulas donde la droga se encuentra confinada en un centro (solvente) acuoso u oleoso rodeado de una membrana (caparazón), por ejemplo, una membrana polimérica, o bien la droga se encuentra adsorbida en la superficie (Figura 7).^{8,17,18}

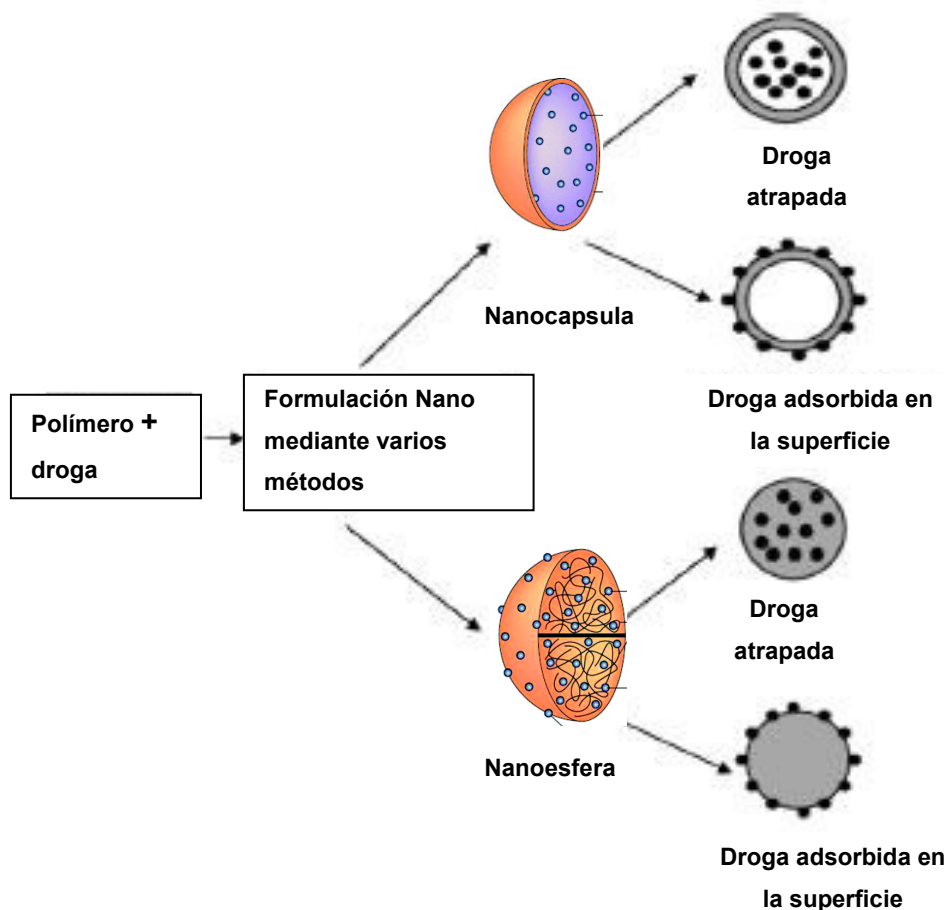


Figura 7. Clasificación de las nanopartículas. *Adaptada de la referencia 18*

El sistema de liberación de drogas en base a nanopartículas puede ser logrado por el mecanismo pasivo o activo. El mecanismo pasivo es logrado por el tamaño pequeño y por el largo tiempo de circulación de las partículas que facilita la acumulación en el sitio patológico como resultado probable de la permeabilidad capilar incrementada localmente, mientras que en el mecanismo activo la superficie de las nanopartículas se encuentran modificadas con moléculas específicas que interaccionan con los tejidos permitiendo que las drogas alcancen el sitio de interés con alta especificidad.⁹

Por otro lado, las drogas atrapadas o adsorbidas pueden ser liberadas de las nanopartículas transportadoras por desorción, difusión, erosión, por un proceso combinado de erosión y difusión, por hinchamiento o por degradación.^{2,9}

3.3.1.1. Tipos de nanopartículas

a. Nanopartículas poliméricas

Los polímeros son sustancias químicas de alto peso molecular, sintetizados a partir de pequeñas unidades llamadas monómeros. Los polímeros de acuerdo al origen se pueden clasificar en polímeros naturales y sintéticos, mientras que por su comportamiento térmico se clasifican en termofijos (se caracterizan por ser entrecruzados, rígidos, intractables con organización tridimensional molecular densa, asimismo se descomponen con el calor y no se pueden moldear) y en termoplásticos (se caracterizan por ser lineales o ramificados, se degradan fácilmente, se funde con el calor y por lo tanto se pueden moldear). Siendo los termoplásticos subcategorizados como amorfo, cristalino y líquido cristalino. Los polímeros amorfos poseen una estructura molecular con rearmiento irregular (Figura 8) y generalmente en estos materiales el empaque molecular es muy pobre. Mientras que los polímeros cristalinos poseen regiones organizadas es decir que las cadenas poliméricas forman un rearmiento molecular ordenado característico de un cristal. Asimismo, todos los polímeros cristalinos tienen regiones amorfas entre las regiones de conexión de las fases cristalinas (Figura 8) y por lo tanto frecuentemente son llamados polímeros semicristalinos. Por lo tanto, un polímero puede ser considerado parcialmente cristalino y parcialmente amorfo. Los dominios cristalinos actúan como una red de reforzamiento así como un material compuesto y mejora el rendimiento del material sobre un amplio rango de temperatura. Sin embargo, mucha cristalinidad causa una disminución del brillo.¹⁹

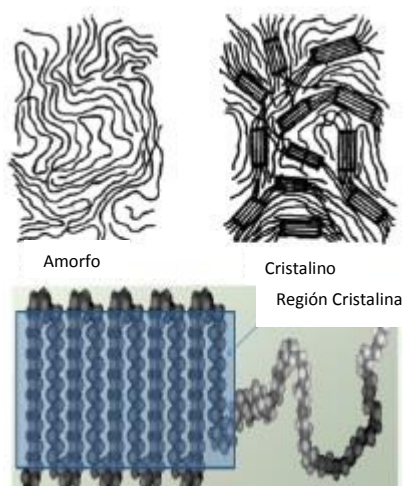


Figura 8. Estructura de los polímeros. *Adaptada de la referencia 19*

Desde los inicios del siglo XXI, la investigación en la interface de la química polimérica y ciencias biomédicas ha alcanzado el desarrollo de los primeros polímeros de tamaño nano (5 - 100 nm) para fines farmacéuticos.²⁰

Las nanopartículas poliméricas han sido exploradas extensivamente en la solubilización, estabilización y liberación de la droga en el sitio objetivo. Las nanopartículas poliméricas en el área de sistema de liberación de drogas presentan la ventaja de alta estabilidad, alta capacidad de carreo de drogas hidrofílicas e hidrofóbicas y la disponibilidad de administración por diferentes rutas. Además, dependiendo de la tecnología empleada para su producción, dos tipos de sistemas pueden ser generados: nanocapsulas y nanoesferas.⁸

Un amplio espectro de biomateriales poliméricos se encuentra disponible para la producción de nanopartículas, las cuales son removidas del cuerpo humano por opsonización y fagocitosis. Para prevenir el reconocimiento del sistema inmune huésped y para prolongar el tiempo de circulación en la sangre se ha desarrollado la modificación de la superficie con cadenas hidrofílicas (ejemplo polietilenglicol).⁸

Entre las nanopartículas aprobadas clínicamente se encuentran las plataformas poliméricas constituidas de polietilenglicol y poli(D,L-ácido láctico) para la liberación de drogas anticancerígenas, contra la hepatitis y contra la degeneración macular. Además, en ensayos clínicos y desarrollo preclínico se encuentran las nanopartículas constituidas de poliglutamato, policiclodextrina, poli(iso-hexil-cianoacrilato), HPMA (N-(2-hidroxilpropil)metacrilamida), micelas (polivinilalcohol, poli(ácido láctico-co-

glicólico)-bloque-poli(etilenglicol), dendrímeros (polipropilenimina, PAMAM (poliamidoamina), copolímero polietilenglicol-poli(L-Lisina), poli(glicerol-ácido succínico)) y nanopartículas de polisacáridos como alginato y quitosano para el tratamiento de diferentes enfermedades.³

Las drogas para el tratamiento de la TBC como INH, PZA y RIF en la actualidad han sido encapsuladas en biopolímeros como poli(n-butilcianoacrilato) (PBCA), polisobutilcianoacrilato (PIBCA), alginato, poliácido láctico (PLA), poliácido láctico-co-poliácido glicólico (PLGA), quitosano-Tripolifosfato (TPP), poliácido aspártico-poli(etilenglicol) (PAA-PEG), tribloque PLGA-PEG-PLGA, entre otros, siendo los resultados de la actividad biológica más eficiente que la droga libre.^{2, 4, 8, 21, 22, 23, 24}

Dendrímeros

Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas de estructura tridimensional altamente ramificadas y son sintetizados vía síntesis divergente o convergente. El crecimiento de estos polímeros inicia de una molécula ubicada en el centro y su crecimiento se desarrolla hacia afuera. Los dendrímeros pueden ser anfífilos basados de un centro hidrofóbico y de ramificaciones hidrofílicas (Figura 9). Asimismo, su superficie presenta funcionalizaciones múltiples lo cual lo hacen candidatos atractivos para la encapsulación y liberación de agentes de diferentes drogas (incluyendo drogas antituberculosis) para ser administradas por diferentes rutas. Sin embargo, los dendrímeros que poseen grupos terminales amino presentan toxicidad (hemólisis, desintegración de los eritrocitos). El tamaño de los dendrímeros en sistemas de liberación de drogas usualmente se encuentra en el rango de 10 a 100 nm.^{2, 8, 25}

Nanopartículas dendriméricas manosiladas de quinta generación (5G) PPI (polipropilenimina) han sido desarrolladas para la liberación de RIF a los macrófagos. Por otro lado, se ha desarrollado el dendrímero polilisina-poli(etilenglicolado) para el encapsulamiento de drogas en el tratamiento de diversas enfermedades como tuberculosis, cáncer, HIV y para enfermedades linfáticas.²

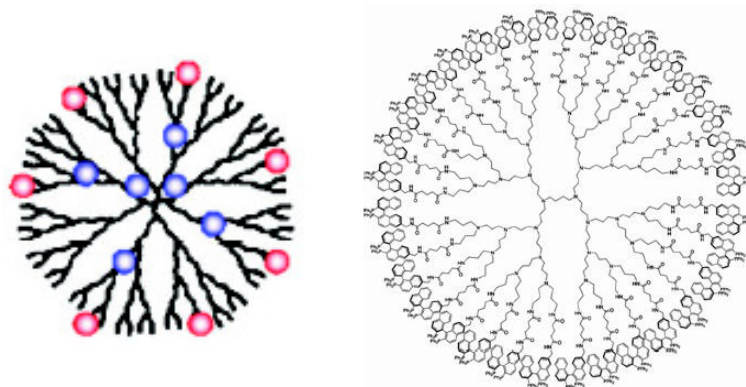


Figura 9. Dendrímeros⁸

Micelas

Las micelas poliméricas son vehículos poliméricos (usualmente debajo de 50 nm en diámetro) generados por polímeros anfifílicos en agua por encima de la concentración micelar crítica (CMC). El bloque hidrofílico son expuestos al medio acuoso formando el caparazón micelar que facilita la solubilización de la micela en agua y a su vez estabiliza al agregado, mientras que el bloque hidrofóbico forma el centro micelar el cual es un dominio que asegura la incorporación de drogas hidrofóbicas mediante interacción física o conjugación química conduciendo a una solubilidad más alta (Figura 10). Además, las drogas ubicadas en el centro de la micela son protegidas del proceso de degradación biológica y química.^{8, 25}

Entre los polímeros usados para la preparación de micelas para la liberación controlada de drogas están el políácido láctico, poli(ϵ -caprolactona), políácido glicólico, poliaminoácidos (políácido aspártico, políácido glutámico, poli(L-lisina) y polihistidina). Así es que para la liberación del RIF se ha desarrollado las micelas poliméricas con los siguientes copolímeros polietilenglicol-políácido láctico, poli(L-ácido láctico)-poli(D-ácido láctico).^{8, 25}

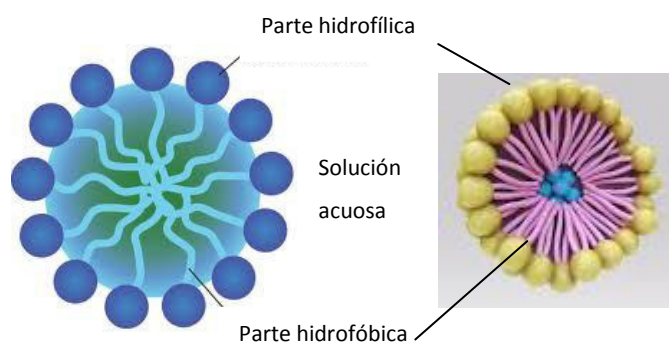


Figura 10. Micelas. *Adaptada de la referencia 8*

b. Nanopartículas no poliméricas

Entre ellas tenemos a los liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos, nanoemulsiones, nanosuspensiones, niosomas, entre otros.

Actualmente, entre las nanopartículas no poliméricas aprobadas clínicamente se encuentran las plataformas de liposomas para la liberación de drogas anti cancerígenas, contra la hepatitis A, influenza, degeneración macular y la menopausia, además, se tienen a las plataformas nanocristalinas como aplicación antihiperlipidémico (disminución del alto contenido de lípidos en la sangre) e inmunosupresante. Por otro lado, en ensayos clínicos y desarrollo preclínico se encuentran las nanopartículas de liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas basado en albúmina, nanopartículas basado en virus, nanopartículas metálicas y de cerámica para el tratamiento de diferentes enfermedades.³

Liposomas

Los liposomas son vesículas de tamaño nano o micro constituido de una bicapa fosfolipídica el cual rodea al centro acuoso del liposoma, donde se lleva a cabo la encapsulación de drogas hidrosolubles, mientras que el dominio hidrofóbico atrapa a los agentes insolubles (Figura 11). Los liposomas son rápidamente reconocidos por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial llegando a ser transportadores ideales de las drogas a los macrófagos, en particular cuando los fosfolípidos con carga negativa son incluidos en la formulación del liposoma que mejora el enlace y la toma por los macrófagos. Por otro lado, para prevenir la eliminación y para extender los tiempos de circulación, los liposomas son usualmente copolimerizados con polietilenglicol.^{8,9}

En investigaciones recientes se han desarrollado liposomas conteniendo PYZ y RIF. Además, se han desarrollado el encapsulamiento de INH y RIF en liposomas para combatir al *Mycobacterium tuberculosis* lo cual revelaron que debajo de las concentraciones terapéuticas fueron más efectivas que las drogas libres.⁸ Estos liposomas fueron compuestos de una mezcla de fosfatidilcolina, colesterol, diacetilfosfato, O-esteroilamilopectina y monosialogangliosidos/diasteroilfosfatidil-etanolamina-polietilenglicol.²

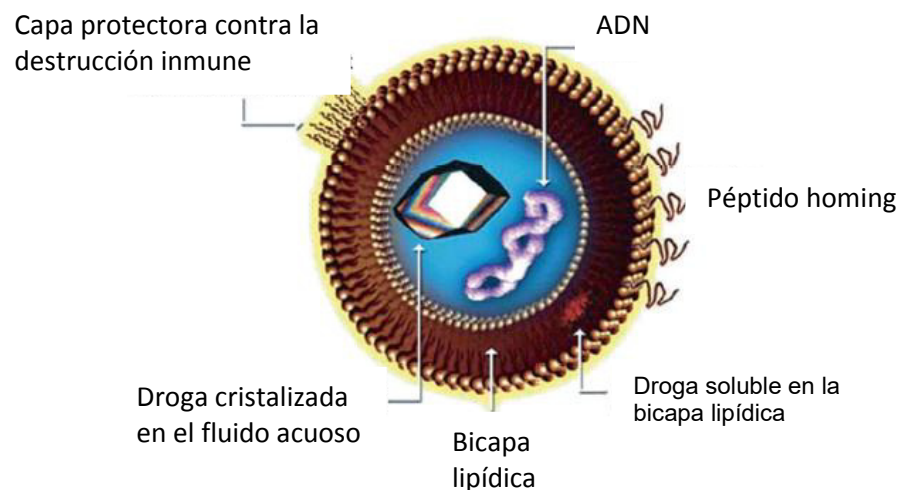


Figura 11. Liposomas. *Adaptada de la referencia 8*

Niosomas

Los niosomas son estructuralmente similares a los liposomas y están constituidos principalmente por un surfactante no iónico y con o sin incorporación de lípidos (Figura 12). Los niosomas son biodegradables, biocompatibles, no inmunogénico en la naturaleza y exhibe flexibilidad estructural. Además, son termodinámicamente estables así como lo son los liposomas. Los niosomas pueden ser elaborados con colesterol, con componentes que inducen carga tales como fosfolípidos cargados (por ejemplo dicetilfosfato y estearilamina) y surfactantes no iónicos (por ejemplo monoalquil o dialquilpolioxietiléneter). Asimismo, en el centro se pueden incorporar a las drogas hidrofílicas, mientras que las drogas lipofílicas son atrapadas por los dominios hidrofóbicos. Los niosomas presentan las ventajas de incorporar un gran número de sustancias, presentar alta estabilidad, no necesitar condiciones especiales de transporte y almacenamiento, y en su preparación no se emplea materiales costosos.⁸

En el caso de la RIF encapsulada en niosomas puede llegar a un tamaño micro (8 a 15 μm) mejorando la estabilidad de la droga.²

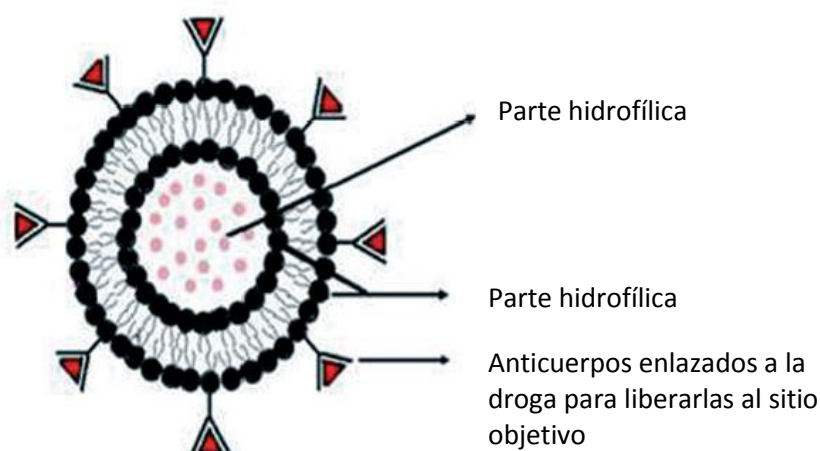


Figura 12. Niosomas. *Adaptada de la referencia 8*

Nanopartículas de lípidos sólidos (SLN)

Las nanopartículas de lípidos sólidos están formadas por suspensiones nanocristalinas de lípidos preparados en agua. Esto provee una mejor eficiencia de encapsulamiento que los liposomas.⁹

Las nanopartículas de lípidos sólidos presentan ventajas importantes como la composición (compuestos fisiológicos) y la producción a larga escala favorecida por la viabilidad para evitar solventes orgánicos en el proceso de manufactura.²

Las nanopartículas de lípidos sólidos conteniendo RIF, INH y PYZ mostraron un efecto esterilizante porque no se detectó el bacilo de la tuberculosis en los pulmones ni en el bazo.²

Nanosuspensiones

Son dispersiones coloidales de drogas puras estabilizadas con surfactantes de tamaño submicro. Se obtienen mediante el método de nanonización (pulverización) el cual consiste en la reducción del tamaño promedio de las partículas sólidas de las drogas a la escala nano. Es una técnica útil para mejorar la solubilidad de las drogas en agua y

lípidos. Entre los diferentes solventes que son empleados para solubilizar la droga, en el proceso de nanonización, se encuentran el DMSO, metanol, etanol y éter. Además, la caracterización de la distribución del tamaño indica que las nanosuspensiones muestran distribuciones de tamaño homogéneo donde las partículas poseen forma esférica de diámetros entre 400 nm a 3 μ m, cuyos tamaños varían al cambiar las condiciones del proceso.⁸

Suspensiones nanocristalinas de drogas pobremente solubles tales como riminofenazinas y clofazimina han sido preparadas fácilmente, liofilizadas y almacenadas por un largo periodo de tiempo representando una formulación de nuevas drogas prometedoras para la terapia intravenosa de infecciones micobacteriales.⁸

Nanoemulsiones

Son dispersiones de aceite en agua termodinámicamente estables mostrando tamaños de gotas entre 10 y 100 nm, los cuales son generados espontáneamente y pueden ser producidos en una escala larga sin la necesidad de emplear una alta energía de estabilización. Además pueden ser esterilizados y liofilizados.⁸

Se han preparado nanoemulsiones aceite/agua de RIF para administración parenteral, en el rango de tamaño 47 y 115 nm, usando excipientes GRAS (Relacionado Generalmente como Seguro) listados en la Federación de Administración de Drogas (EE.UU.). Por otro lado, se han desarrollado análisis fisicoquímicos de microemulsiones de INH.²

3.3.1.2. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

Evaporación del solvente de una emulsión empleando polímeros hidrofílicos

En este método, el polímero es primero disuelto en agua que a su vez contiene un emulsificante por ejemplo polivinilalcohol (PVA), gelatina, polisorbato 80 o polaxamer-18. Luego, se agrega la droga disuelta en solventes orgánicos volátiles como cloroformo, diclorometano, acetato de etilo y la mezcla es emulsificada para obtener emulsiones aceite/agua, dicha emulsificación es facilitada por homogenización a alta velocidad o por sonicación. Asimismo, para endurecer las gotas de la nanoemulsión en nanopartículas sólidas, el solvente orgánico es evaporado o extraído del sistema

después que este se difunde dentro de la fase acuosa externa.²⁶ Finalmente, este método presenta desventajas en el encapsulamiento de drogas hidrofílicas.²⁶

Evaporación-Extracción del solvente de una emulsión empleando polímeros hidrofóbicos

En esta técnica un polímero hidrofóbico es disuelto en un solvente orgánico tales como cloroformo, acetato de etilo, diclorometano y es emulsificado en una fase acuosa que contiene al surfactante, por ejemplo, PVA. Después de la formación de la emulsión, se evapora el solvente lo cual conduce a la precipitación, es decir a la formación de nanoesferas, las cuales son purificadas por eliminación del surfactante.¹⁵ Esta técnica es más útil para encapsular drogas lipofílicas las cuales pueden ser disueltas en la solución del polímero.¹⁵

Nanoprecipitación o desplazamiento del solvente

En este método, el solvente orgánico seleccionado se encuentra completamente disuelto en la fase acuosa externa, por lo tanto no existe la necesidad de evaporación o extracción para precipitar al polímero. El polímero y la droga están disueltos en acetona, etanol o metanol y se vierte, bajo agitación magnética, a una solución acuosa que contiene al surfactante. El solvente orgánico se difunde instantáneamente a la fase acuosa externa, seguido por la precipitación del polímero y la droga. Después que las nanopartículas son formadas, el solvente es eliminado y la suspensión es concentrada bajo presión reducida.¹⁵ Este método es limitado para drogas que son altamente solubles en un solvente polar.¹⁵

Cristalización por precipitación (Salting out)

Esta técnica es parecida a la nanoprecipitación, sin embargo, la miscibilidad de ambas fases es impedida por la saturación de la fase acuosa externa que contiene al surfactante, por ejemplo, PVA. Por lo tanto, este procedimiento se basa en la precipitación de un polímero hidrofóbico empleado para la encapsulación de drogas hidrofílicas o hidrofóbicas. Siendo así que la droga es disuelta en una variedad de solventes incluyendo polares (acetona, o metanol) y no polares (diclorometano o cloroformo). La precipitación ocurre cuando una cantidad suficiente de agua es añadida para completar la difusión del solvente, por ejemplo acetona, dentro de la fase acuosa.¹⁵

Coacervación: Separación de fases en sistema acuoso

Mediante esta técnica las drogas hidrofílicas e hidrofóbicas pueden ser encapsuladas. En este método se forman dos fases (por cambio de pH, contraiones o por un no solvente del polímero), siendo estas fases: la fase de coacervación (gotas líquidas del polímero) y la fase líquida del sobrenadante. Finalmente, para obtener a las nanopartículas se solidifica a las gotas líquidas del polímero por extracción o evaporación del solvente.²⁶

En este método, solventes orgánicos tales como diclorometano, isopropanol y heptano han sido usados como solventes, agentes coacervantes y agentes de solidificación.²⁶

La principal ventaja del método de coacervación es que protege a las drogas activas de dividirse fuera y dentro de la fase dispersa. Sin embargo, es un proceso muy costoso.²⁶

Microemulsión con polímeros hidrofílicos

Esta técnica está basada en la formación de nanopartículas en el centro acuoso de las gotas micelares reversas con el desarrollo de entrecruzamiento. En este método, el surfactante se encuentra disuelto en un solvente no polar (por ejemplo: hexano) y esta solución es agregada a la solución acuosa del polímero conteniendo el agente entrecruzante (por ejemplo: glutaraldehído) bajo una agitación continua y a temperatura ambiente formándose, luego, las nanopartículas. Después, el solvente orgánico es removido por evaporación y el exceso de surfactante es removido por precipitación, siendo este último, removido por centrifugación. Finalmente, las nanopartículas en suspensión son dializadas y luego liofilizadas.²⁷

La desventaja que ofrece este método es el uso de solventes orgánicos, el alto consumo de tiempo en el proceso de preparación y la complejidad de los pasos de los lavados.²⁷

Doble emulsión con polímeros hidrofóbicos

En este método, el polímero se encuentra disuelto en un solvente orgánico no polar y esta solución es agregada sobre una solución acuosa que contiene la sustancia activa bajo sonicación u otro proceso físico, formándose la primera emulsión. Luego, se

añade una tercera solución acuosa que contiene al estabilizador (por ejemplo: PVA) bajo agitación y a temperatura ambiente para evaporar al solvente, formándose la segunda emulsión. Luego, la suspensión acuosa de las nanopartículas es centrifugada y el pellet obtenido es resuspendido en agua para ser sometido a liofilización.²⁸

Fluido supercrítico

Mediante esta técnica, la droga y el polímero son disueltos en un solvente orgánico apropiado y luego esta solución es atomizada a través de un inyector dentro del CO₂ supercrítico (obtenido fácilmente a 73,8 bar y 31,05 °C). El solvente orgánico y el CO₂ se difunden entre si y como el CO₂ es miscible con el solvente, el solvente llega a ser extraído causando que el sólido insoluble en el fluido supercrítico precipite como nanopartículas. Luego, el polvo seco micronizado obtenido es colectado para la despresurización del CO₂. Existen varios parámetros que pueden afectar el tamaño y la morfología de las partículas como la temperatura de pre y post-expansión, la geometría del inyector y la concentración de la solución.²⁶

Esta tecnología presenta la ventaja de que los solventes orgánicos y surfactantes puedan ser evitados o minimizados, produciendo nanopartículas libres de impurezas tóxicas. Sin embargo, la desventaja de este método incluye el uso de altas temperaturas para formar precipitados homogéneos (degradando drogas térmicamente lábiles) y, por otro lado, la limitada solubilidad de los polímeros y drogas producen un bajo porcentaje de carreo de la droga.²⁶

Secado por atomización a bajas temperaturas (Spray Freeze drying)

Esta técnica consiste en la atomización de una solución acuosa de la droga vía dos fluidos o inyector ultrasonido dentro de una cámara de atomización llenado con líquido criogénico (nitrógeno líquido) o un refrigerante halocarbono como clorofluorocarbono o fluorocarbono.²⁶

El proceso de atomización puede ser desarrollado debajo o encima de la superficie del líquido criogénico dependiendo de la posición del inyector. Aunque también se puede introducir nitrógeno líquido directamente dentro de la solución a atomizar. Asimismo, una vez que se da el contacto con el medio criogénico, las gotas del líquido se solidifican rápidamente (en milisegundos) debido a la alta velocidad de transferencia

de calor. Finalmente, cuando el proceso de atomización es completado, todo el contenido puede ser liofilizado.²⁶

Gelación ionotrópica

Esta técnica fue primero reportado por Calvo y ha sido ampliamente examinada y desarrollada por Janes. El mecanismo se basa en la interacción electrostática entre un polímero con grupos cargados positivamente y con los grupos cargados negativamente del polianión o el polímero aniónico. Esta técnica ofrece una preparación simple y suave en un medio acuoso donde el polianión es agregado al polication o viceversa y las nanopartículas son formadas instantáneamente bajo agitación continua y a temperatura ambiente. Luego, la solución coloidal es ultracentrifugada y el producto obtenido es lavado y finalmente resuspendido para futuros análisis. Por otro lado, el tamaño y la carga de la superficie de la partícula pueden ser modificados variando la proporción de los polímeros iónicos, la concentración, el pH, la temperatura y el orden de adición de los polímeros.^{27, 29}

3.3.1.3. Interacción de las nanopartículas con los macrófagos

En la Figura 13 se observa el posible mecanismo por el cual la droga encapsulada en la nanopartícula es liberada dentro del macrófago infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. Los macrófagos por su potencial fagocítico y microbiano se encargan de defender a las células contra partículas extrañas y patógenos respirados en el aire manteniendo, de esta manera, a los pulmones limpio y estéril.²⁶

La endocitosis, específicamente fagocitosis, es el mecanismo más probable, responsable de la toma intracelular de las nanopartículas por los macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto, las opsinas (tales como proteínas, glicoproteínas y glicolípidos) precipitan sobre la superficie de la nanopartícula formando un complejo reconocible por los receptores de los macrófagos, el cual luego enlaza al complejo con su superficie celular permitiendo la toma de la partícula a través de las extensiones de los pseudópodos. Luego, la fusión de los pseudópodos causa la internalización de la nanopartícula en el macrófago formándose los fagosomas, los cuales se fusionan con los lisosomas (conteniendo hidrolasas ácidas), formándose de esta manera los fagolisosomas, a partir del cual se libera la droga. Cabe mencionar que los lisosomas tienen la habilidad de degradar al polímero

(transportador de la droga).²⁶ Además, cuando las partículas poseen un diámetro mayor a 200 nm son rápidamente enlazadas con las proteínas opsoninas y eliminadas del cuerpo por el hígado y el bazo.³⁰

Por otro lado, se debe mencionar que la liberación de la droga puede ser vía el mecanismo de difusión pasiva o activa. La difusión pasiva es la más lograda por el tamaño pequeño de las partículas y por el largo tiempo de circulación de las partículas que facilitan la acumulación en el sitio patológico, posiblemente como resultado de la permeabilidad capilar incrementada localmente. Por otro lado, con la difusión activa, la superficie de las nanopartículas es modificada con moléculas específicas (dispositivos de seguimiento) que reconocen precisamente e interactúan específicamente con receptores localizados sobre el tejido objetivo.^{9, 31}

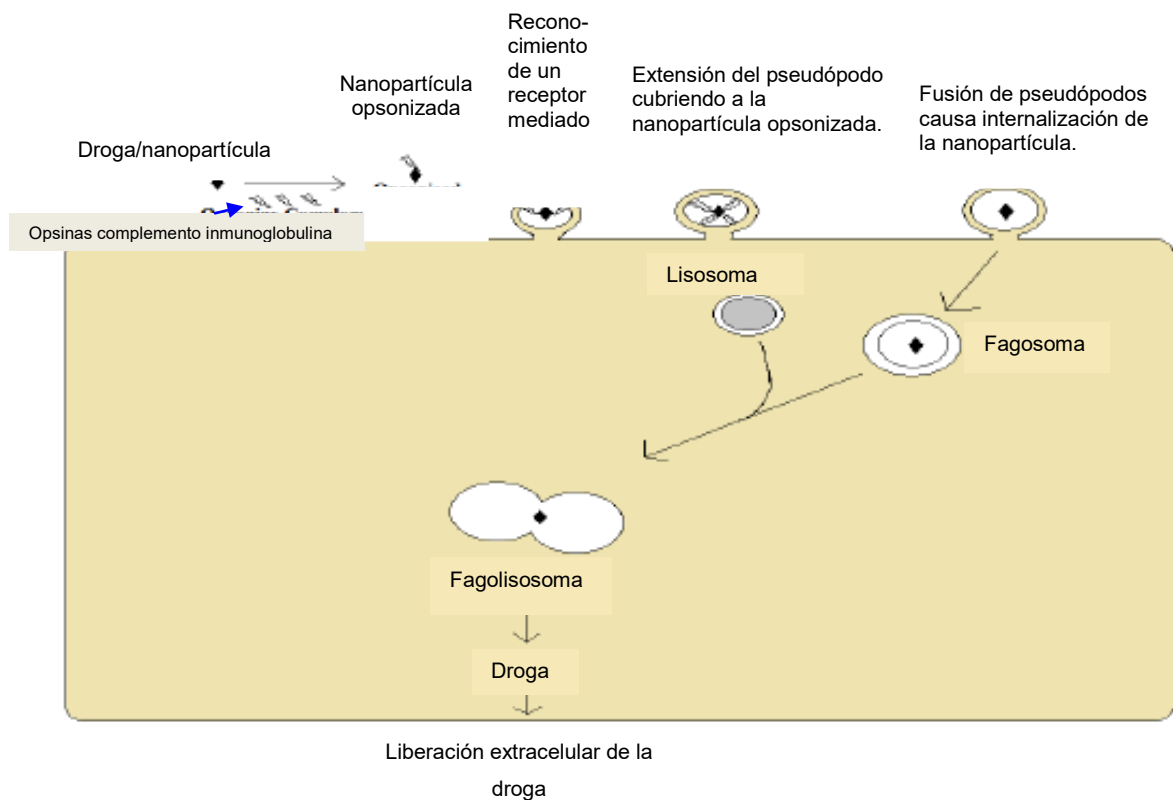


Figura 13. Posible mecanismo por el cual la droga encapsulada en la nanopartícula es liberada en el macrófago infectado para el tratamiento de la TBC. *Adaptada de la referencia 26*

3.3.1.4. Rutas de administración de nanopartículas basadas en drogas para el tratamiento de la TBC

Administración oral

La estabilidad de las nanopartículas ofrece la posibilidad de la administración oral. La toma de las nanopartículas ocurre primero por transcitosis vía las células M, luego ocurre la toma intracelular y el transporte vía las células epiteliales que cubren la mucosa intestinal. Por último, ocurre la toma de las nanopartículas vía las placas de Peyer.¹⁷

El comportamiento de las nanopartículas poliméricas en el tracto gastrointestinal está influenciado por sus propiedades bioadhesivas, la adhesión de las nanopartículas a la mucosa mejora la absorción de la droga asociada, incrementando su biodisponibilidad.¹⁷

Por otro lado, se han desarrollado nanopartículas poliméricas como poliácido láctico, el copolímero ácido poliláctico-co-glicólico y el ácido poliláctico-co-glicólico funcionalizado con lectina que encapsulan a las drogas antituberculosas INH, PZA y RMP con aplicación para la administración oral.¹⁷

Administración por inhalación

Las ventajas de una administración directa (por inhalación) de las drogas antituberculosas a los pulmones incluye la posibilidad de reducir la toxicidad sistémica así como lograr altas concentraciones de las drogas en el sitio principal de la infección. Además, en contraste con la administración oral, las drogas inhaladas no están sujetas al primer paso del metabolismo.¹⁷

Se han desarrollado nanopartículas poliméricas con aplicación para la administración por inhalación como el copolímero ácido poliláctico-co-glicólico, el ácido poliláctico-co-glicólico funcionalizado con lectina y las nanopartículas de lípidos sólidos que encapsulan a las drogas antituberculosas INH, PZA y RMP.¹⁷

Administración intravenosa o parenteral

Las micropartículas con diámetros mayores a 1 μm no pueden ser administradas vía las rutas intravascular. Por el contrario, las nanopartículas eficientemente pueden ser administradas vía esta ruta debido a su tamaño pequeño permitiendo el paso intracapilar seguido de una toma celular eficiente. Asimismo, esta tecnología mejora la liberación de la droga a los macrófagos incrementando la cantidad de droga en el sitio objetivo el cual permite la reducción de la dosis terapéutica y la reducción de los efectos secundarios.¹⁷

La toma preferencial de las nanopartículas por los macrófagos, principalmente por las células Kupffer en el hígado, se lleva a cabo mediante una liberación pasiva de la droga a los sitios inflamados donde el endotelio presenta permeabilidad como resultado del proceso patológico. Por otro lado, existen nanopartículas de muy larga duración que se acumulan pasivamente en sitios de vasculatura con fisuras, logrando evadir a los macrófagos residentes en el hígado alcanzando, con una alta probabilidad, otros sitios en el cuerpo.¹⁷

Finalmente, como ejemplo, en la administración intravenosa, se han desarrollado nanopartículas poliméricas utilizando en la formulación el polímero polibutílicoacrilato que encapsulan a las drogas antituberculosas INH, PZA y RMP.¹⁷

Administración subcutánea

En la administración subcutánea se ha demostrado que con una simple dosis de inyección subcutánea, de la droga encapsulada, se produce un efecto esterilizante en los pulmones y en el bazo, demostrando una mejor eficacia quimioterapéutica que el tratamiento convencional basado en dosis diarias de las drogas libres.¹⁷

3.4. Caracterización de polímeros y nanopartículas poliméricas

3.4.1. Técnicas para determinar el peso molecular de polímeros

3.4.1.1. Dispersión de Luz Estática (SLS)

Es una técnica no-invasiva que sirve para medir el tamaño de las partículas.³² Además, esta técnica mide las intensidades promedio de la luz dispersada en función del tiempo. Asimismo, a partir de esta técnica se puede determinar el peso molecular

(M), el radio de giro (R_g) y el segundo coeficiente virial (A_2), el cual caracteriza la interacción soluto-solvente.³³

En esta técnica, una radiación monocromática de intensidad I_0 incide sobre la muestra originándose una luz dispersada de intensidad I_θ en un tiempo promedio, la cual es detectada a un ángulo θ . Asimismo, se transmite una luz de intensidad I a un ángulo cero (Figura 14).³⁴

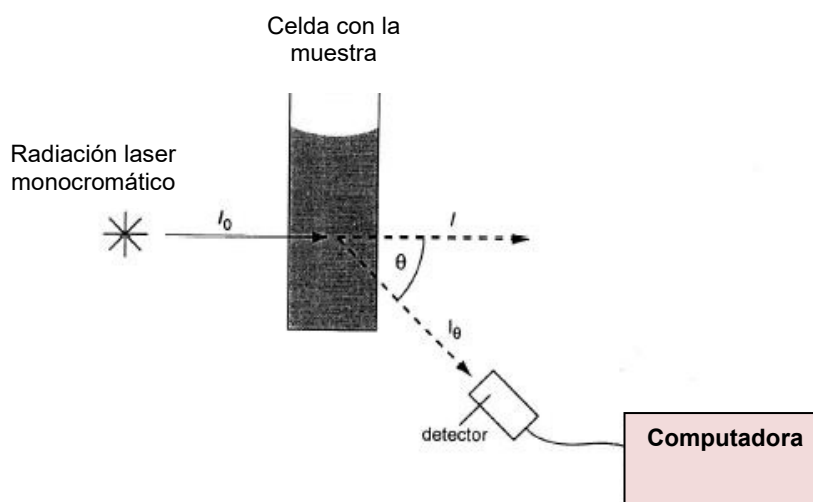


Figura 14. Principio de Dispersión de Luz Estática (SLS). *Adaptada de la referencia 34*

Por otro lado, existen tres tipos de SLS, basados en la turbidez (proporciona un peso molecular crudo estimado para estructuras largas, considerando la intensidad de luz transmitida, I), dispersión de luz con un ángulo pequeño (proporciona la información del peso molecular y distribución del peso molecular) y dispersión de luz con multiángulos (proporciona información más confiable del peso molecular y de la distribución del peso molecular). Esta última técnica está basada en la ecuación de Debye-Zimm:³⁴

$$Kc/R_\theta = 1/MP_\theta \quad \text{..... (Ecuación 1)}$$

Donde: Kc es una constante experimental que depende del cuadrado del índice de refracción del solvente, R_θ es la proporción en exceso de Rayleigh (proporción de la intensidad de la luz dispersada en exceso, I_θ , comparado al solvente puro), M es el peso molecular en Dalton y P_θ es el factor forma el cual varía con el tamaño y forma del polímero en solución.³⁴

Por lo tanto, dicha ecuación forma la gráfica de Zimm, un método que puede conducir a la determinación del peso molecular (M).³⁴

3.4.1.2. Cromatografía de permeación por gel (GPC)

La técnica GPC involucra la permeación de una solución polimérica a través de una columna empacada con esferas de diferentes diámetros de poro de una matriz polimérica. Las moléculas pasan a través de la columna, es decir a través de las esferas y del volumen intersticial (volumen entre las esferas). Siendo el transporte más rápido por el volumen intersticial que a través de los poros de las esferas. Por lo tanto, las moléculas más pequeñas, en la columna, penetran en todas las esferas debido a que su volumen hidrodinámico es más pequeño que el tamaño del poro de dichas esferas. Por otro lado, las moléculas más grandes de polímero no penetran todas las esferas porque su tamaño molecular es más grande que el tamaño del poro de algunas de ellas. Por lo tanto, el transporte será más rápido a través del volumen intersticial (Figura 15). Asimismo, el tiempo que las moléculas de polímero pasan a través de la columna disminuye con el incremento del peso molecular (Figura 15). Además, mediante el uso de uno a tres detectores apropiados (diferencial de índice de refracción (DIR), dispersión de la luz (LS) y otros) se puede medir la cantidad de polímero que pasa a través de la columna como una función del tiempo. Esta información y con uso de una calibración de la columna con muestras de polímero estándar de peso molecular conocido permiten obtener la distribución del peso molecular a partir de la gráfica fracción de peso w_x y peso molecular M_x obteniéndose los valores de peso molecular promedio en número (Mn) y de peso molecular promedio en peso (Mw).^{35,36} Por otro lado, al emplear dos detectores como diferencial del índice de refracción y luz dispersada no es necesario construir una curva de calibración obteniéndose de igual manera Mn y Mw porque el gráfico de índice de refracción se emplea como una línea de base por el software para calcular el peso molecular a partir de la gráfica de luz dispersada (Figura 16).^{37,38}

En la Figura 16, se observa el cromatograma de una muestra polimérica de poliestireno empleando los detectores diferencial de índice de refracción (DIR) y dispersión de luz a diferentes ángulos (90, 35 y 145 °). Asimismo, con ambos detectores, a diferente escala, se observa en las gráficas un pico ancho hacia arriba de la línea base que prácticamente coinciden en las cuatro gráficas, en este caso, en el volumen de elución. Sin embargo, con el detector DIR, al extremo derecho, se

observa en la gráfica picos por encima y debajo de la línea base, los cuales representan a los artefactos del instrumento después de que las muestras han pasado a través de la columna.³⁷ Por otro lado, el peso molecular está en función del área debajo de la curva del pico ancho. Siendo, la gráfica de dispersión de luz que proporciona los valores para determinar el peso molecular, mientras que con la gráfica de DIR se puede determinar la concentración de la muestra.³⁸

Por otro lado, el peso molecular promedio en número, M_n , es el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, dividido por el número total de moléculas poliméricas en dicha muestra. El peso molecular promedio en peso, M_w , está más bien dominado por las moléculas de mayor tamaño que aportan la mayor parte de la masa total de la muestra polimérica. Por lo tanto, M_w es siempre mayor que M_n .^{35, 36}

Asimismo, la relación de los dos pesos moleculares M_w/M_n , la cual depende de la amplitud de la curva de distribución, se usa como una medida de la polidispersidad en un polímero. El valor de M_w/M_n de uno indica que el polímero es monodisperso. Sin embargo, si es mayor a la unidad indica que el polímero es polidisperso.^{35, 36}

En la técnica GPC empleando los detectores diferencial de índice de refracción y luz dispersada con multiángulos (SEC/MALS) se emplea la ecuación (2), a partir del cual se podrá determinar el peso molecular.

$$R_\theta = M_w K^* (dn/dc)^2 c \quad \text{..... (Ecuación 2)}$$

Donde: R_θ es la proporción en exceso de Rayleigh, M_w es el peso molecular, K^* es una constante, c es la concentración, (dn/dc) es el incremento del índice de refracción en unidades (g/mL ó mg/mL) el cual se define como el grado por el cual el índice de refracción de una solución varía cuando la concentración del soluto cambia, sin embargo, generalmente se considera una constante.³⁹

Por otro lado, en el análisis de polímeros lineales se puede emplear poliestireno y polimetacrilato como empaques de la columna GPC.³⁵ De esta manera, para el análisis de polisacáridos, por ejemplo quitosano, se recomienda emplear polimetacrilato hidroxilado.⁴⁰

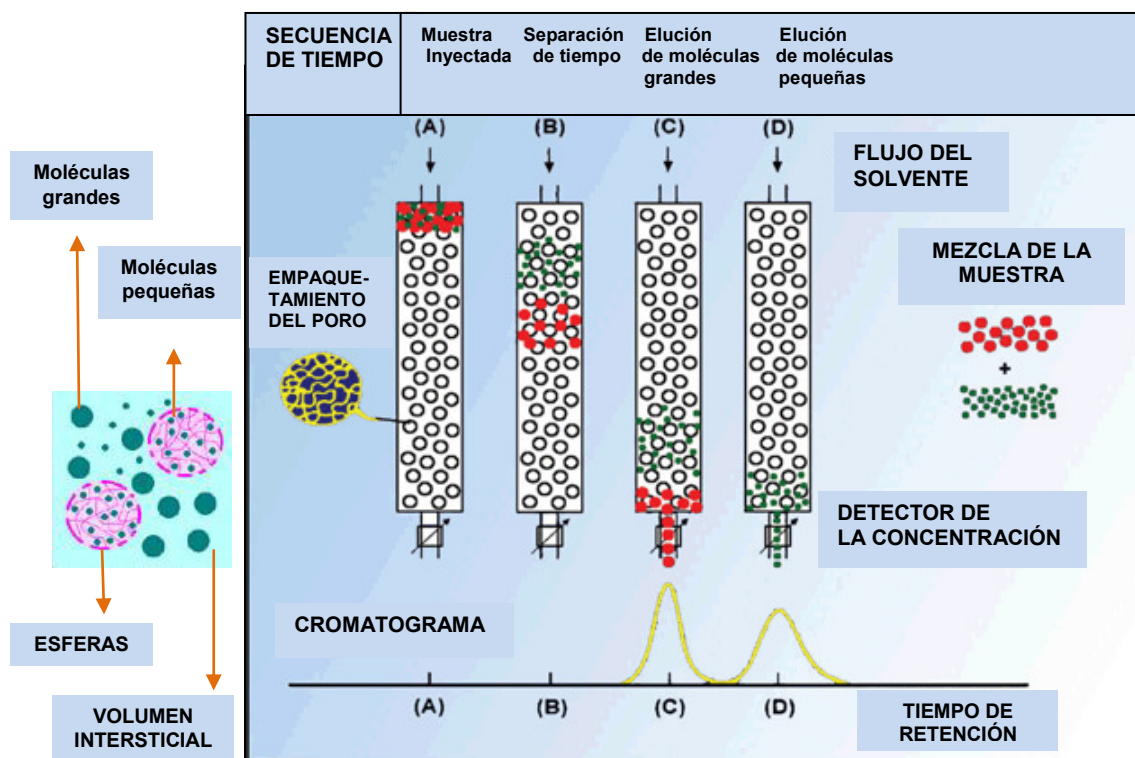


Figura 15. Exclusión de las moléculas por tamaño en la columna GPC. *Adaptada de las referencias 41 y 42*

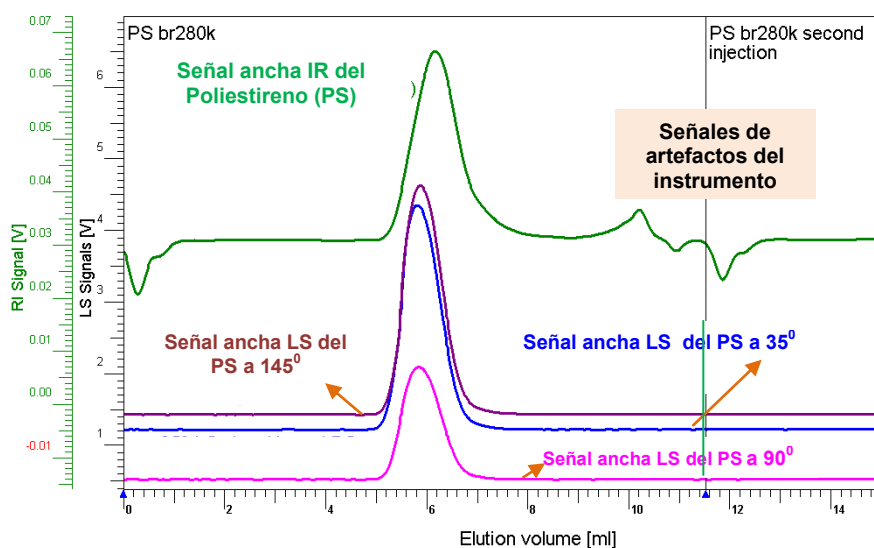


Figura 16. Cromatograma GPC: Diferencial del índice de refracción versus tiempo y peso molecular. *Adaptada de la referencia 37*

3.4.1.3. Viscosimetría intrínseca o capilar

El método de viscosimetría intrínseca o capilar se basa en la relación directa existente entre el peso molecular de un polímero y su viscosidad intrínseca. A partir de las medidas de la viscosidad relativa de una serie de soluciones diluidas del polímero en cuestión en un solvente apropiado, se determina la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, de la solución polimérica. Dada la influencia no solo del tamaño sino también de la forma, del solvente y de la temperatura, sobre la $[\eta]$, no existe una relación simple para el cálculo directo del peso molecular promedio real a partir de las medidas de viscosidad. Sin embargo, la ecuación de Mark-Houwink permite calcular un peso molecular promedio, M_v , a partir de la viscosidad intrínseca (ecuación 3):^{35, 36, 43}

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \text{..... (Ecuación 3)}$$

Las constantes **K** y **a** son específicas para cada combinación de polímero y solvente a una temperatura específica. Por otro lado, uno de los viscosímetros empleados en la determinación del peso molecular por viscosidad es el viscosímetro de Ubbelohde (Figura 17).

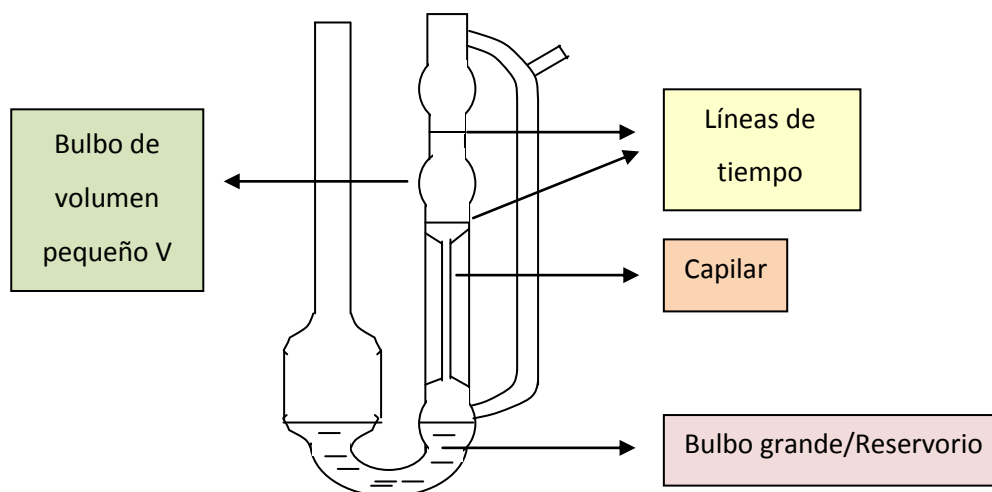


Figura 17. Viscosímetro Ubbelohde

Por otro lado, el peso molecular obtenido por viscosidad, M_v , se acerca más al promedio en peso, M_w , que al promedio en número, M_n , *determinados por GPC*. Este

peso, M_v , dista en un 10 a 20 % del peso molecular promedio real (M_w). Además, en general se cumple que $M_w < M_v < M_n$.^{35, 36}

3.4.2. Técnicas para determinar el tamaño y la morfología de partículas

3.4.2.1. Microscopía por transmisión electrónica (TEM)

En esta técnica se usa una fuente de electrones en vez de luz y debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la longitud de onda de la luz se obtiene una resolución de cien veces mayor que con la microscopía de luz.^{44, 45}

Cuando los electrones son acelerados a niveles de energía muy altos y colisionados sobre la muestra, estos se pueden dispersar o producir fuentes de diferentes señales como rayos X, electrones Auger, electrones secundarios, electrones retrodispersados luz, entre otros, siendo algunos de estos usados en TEM (Figura 18).⁴⁶

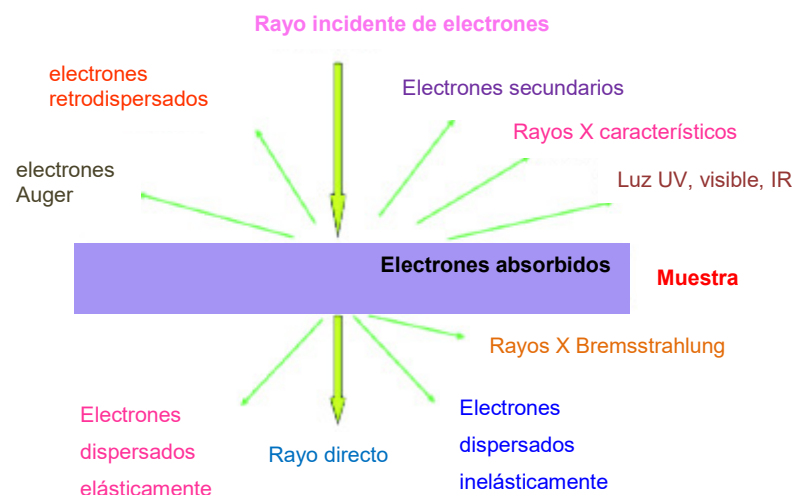


Figura 18. Interacciones entre electrones y el material. *Adaptada de la referencia 47*

El equipo TEM consta de una fuente de electrones, ubicado encima del microscopio, el cual emite electrones que viaja a través del vacío en la columna del microscopio. Luego, los lentes electromagnéticos ajustan a los electrones en un rayo muy delgado el cual viaja a través del espécimen en estudio. Dependiendo de la densidad del material algunos electrones son dispersados y desaparecen del rayo, mientras que los electrones no dispersados golpean una pantalla fluorescente, el cual convierte a los

electrones en una señal de luz visible. La imagen producida puede ser estudiada directamente por el operador o fotografiada con una cámara (Figura 19).⁴⁴

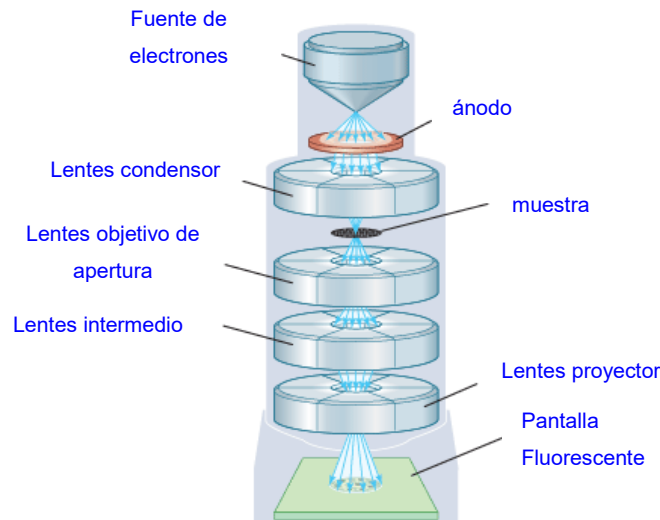


Figura 19. Diagrama del Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM). *Adaptada de la referencia 48*

3.4.2.2. Microscopía por transmisión electrónica por barrido (STEM)

La diferencia entre STEM y TEM se basa en que el sistema de iluminación (comprendido por la fuente de electrones y los lentes condensador) produce rayos de electrones paralelos para las imágenes TEM, mientras que para las imágenes STEM produce rayos convergentes.⁴⁷

Asimismo, en STEM los lentes condensador forman un punto de tamaño pequeño sobre la superficie de la muestra y este a su vez es escaneado con la bobina del escáner, y en paralelo, la señal es detectada por un detector electrónico, amplificado y sincronamente dirigido a un tubo de rayos catódicos con la bobina del escáner. El detector puede detectar a los rayos transmitidos (BF STEM imagen), a los rayos difractados (DF STEM imagen) o puede ser un detector anular (una placa con un agujero) el cual detecta a todos los rayos difractados excepto a los rayos transmitidos (ADF STEM). La resolución de la imagen está únicamente limitada por la calidad de los lentes condensador porque los lentes objetivos no son usados. En general, las imágenes STEM tienen una resolución más pobre pero poseen mejor contraste que las imágenes TEM.⁴⁶

3.4.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica permite el estudio de la morfología y composición de una gran variedad de muestras incluyendo la biológica.⁴⁵

El SEM es un instrumento que usa electrones en vez de luz para formar una imagen magnificada grande. Por lo tanto, un rayo de electrones es producido en la parte superior del microscopio por una fuente de electrones. El rayo de electrones sigue un camino vertical a través del microscopio el cual está sometido a vacío. El rayo viaja a través de los campos electromagnéticos y los lentes, los cuales dirigen al rayo de electrones hacia la muestra (Figura 20). Una vez que el rayo de electrones golpea o es barrido sobre la superficie de la muestra, electrones primarios retrodispersados, electrones Auger, electrones secundarios (mayoría), rayos X son emitidos de la muestra (Figura 21).^{45, 49}

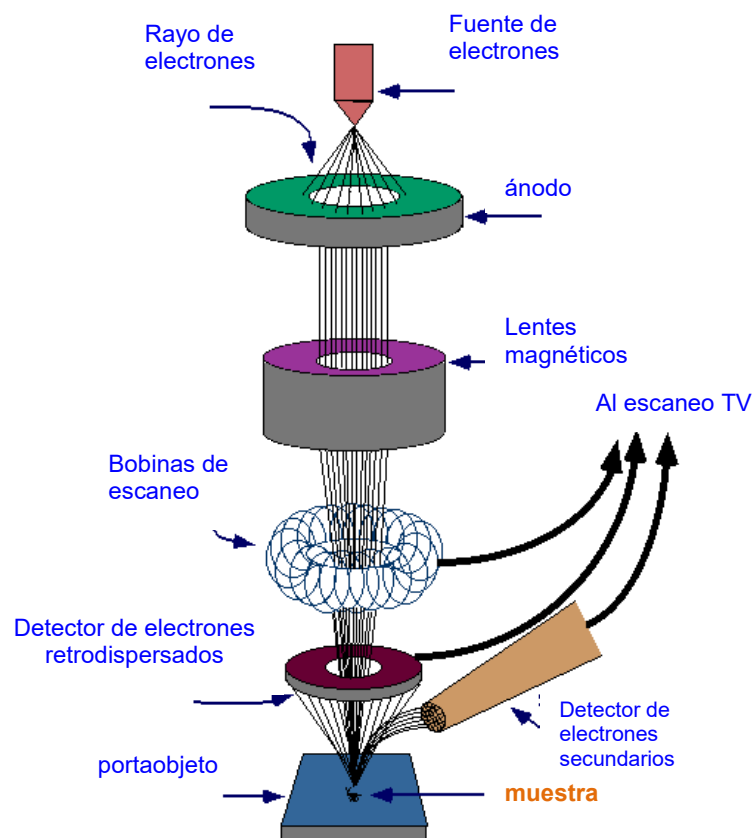


Figura 20. Diagrama del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). *Adaptada de la referencia 49*

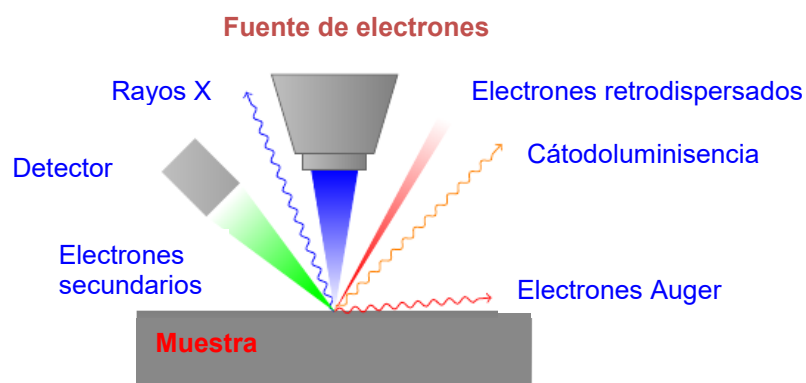


Figura 21. Interacción de los electrones con el material y detección de los electrones secundarios. *Adaptada de la referencia 50*

Los detectores coleccionan estos electrones de un amplio rango de energía y los convierten en una señal que es enviado a una pantalla. Los electrones secundarios son detectados por un cristal centellador o semiconductor, los electrones retrodispersados (de energía idéntica a los electrones primarios) son detectados sin aceleración y los rayos X dispersados son detectados por un espectrómetro dispersivo de longitud de onda.⁴⁵ Los electrones secundarios y retrodispersados son comúnmente usados para producir imágenes de las muestras. Los electrones secundarios son más usados para mostrar la morfología y topografía de las muestras, mientras que los electrones retrodispersados son más empleados para ilustrar contrastes en composición en muestras multifase (discriminación de fase rápida).⁵¹

Por otro lado, las muestras estudiadas por SEM deben estar extentas de líquido y ser conductoras. Las muestras que conducen la electricidad son las más fáciles de estudiar porque la circulación de los electrones permite minimizar los problemas asociados a la acumulación de carga que se produce en su superficie. Esta acumulación de carga produce una zona de carga espacial que defleca el haz incidente produciendo zonas blancas excesivamente brillantes durante la observación. Por lo tanto, si la muestra no es conductora, como la gran mayoría de las muestras de polímeros, será necesario recubrirla con una capa conductora de elementos como Al, Au, Au-Pd, etc, lo cual asegura una buena observación. Asimismo, para la observación de imágenes de electrones secundarios el Au y Au-Pd son los materiales que conducen a los mejores resultados porque, al ser elementos pesados, producen mayor

energía. Finalmente, las muestras que son buenas conductoras de la electricidad son también buenas conductoras del calor, lo que minimiza la probabilidad de su degradación térmica.^{52,53}

3.4.2.4. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Mediante esta técnica se puede analizar y caracterizar muestras a nivel microscópico. Se puede observar las características de la superficie con una resolución muy exacta en el rango $1\text{ }\mu\text{m}$ a $100\text{ }\mu\text{m}$.¹ Además, con esta técnica se puede analizar muestras que no conducen corriente como polímeros, muestras biológicas.⁵⁴

El equipo AFM consta de un láser diodo semiconductor el cual se ubica detrás de un cantiléver (viga que sujeta a una sonda, la cual entra en contacto con la muestra a través de una punta puntiaguda extremadamente fina)⁵⁵, Figura 22.

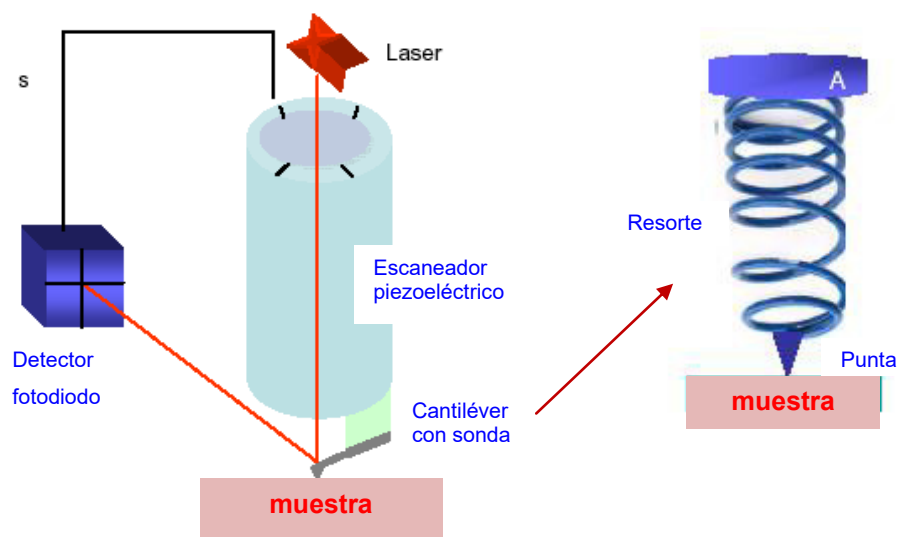


Figura 22. Principio del análisis de Microscopía de Fuerza atómica (AFM). *Adaptada de la referencia 55*

Por lo tanto, el AFM opera midiendo las fuerzas atractivas o repulsivas entre la sonda y la muestra, es decir cuando la muestra es escaneada por la punta del instrumento. La fuerza más comúnmente asociada con microscopía de fuerza atómica es la fuerza interatómica de Van der Waals. Asimismo, existen, principalmente, dos modos de contacto entre la punta del instrumento y la muestra, en el modo de contacto repulsivo la punta del instrumento casi toca la superficie de la muestra, mientras que en el modo

de contacto atractivo la punta no toca a la muestra proporcionando imágenes topográficas de medidas de fuerzas de atracción (Figura 23).⁵⁶ En el modo de contacto la fuerza predominante es de Van der Waals, sin embargo en el modo de no contacto las fuerzas atractivas de Van der Waals son dominantes.⁵⁵

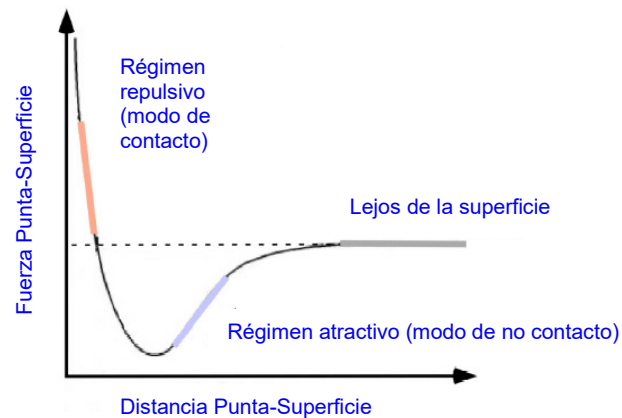


Figura 23. Ploteo de la Fuerza en función de la separación sonda-muestra. *Adaptada de la referencia 57*

Debido a las fuerzas originadas entre la sonda y la muestra se originan las deflexiones del láser, detectados por el detector fotodiodo sensitivo, los cuales son convertidos en un mapa topográfico.⁵⁴

Las imágenes de 3D de AFM son obtenidos sin ninguna preparación costosa y conduce a una información más completa que los perfiles 2D disponible con las muestras de corte-transversal.⁵⁴

3.4.2.5. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Es una técnica no-invasiva que sirve para medir el tamaño de las partículas y moléculas en suspensión a través de las fluctuaciones de la intensidad de la luz en función del tiempo causado por el movimiento Browniano de las partículas y moléculas. Asimismo, el movimiento Browniano consta de un movimiento al azar de las partículas como resultado de las colisiones causadas por el bombardeo de las moléculas del solvente que rodean a las partículas.⁵⁸

La velocidad del movimiento Browniano está definido por el coeficiente de difusión translacional (D) el cual puede ser convertido en el tamaño de la partícula ($dH =$

diámetro hidrodinámico o diámetro efectivo) usando la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 4):

$$d_H = kT/3\pi\eta D \quad \dots\dots\dots \text{(Ecuación 4)}$$

Este movimiento depende del tamaño de la partícula, la viscosidad de la muestra y la temperatura.⁵⁸

En la ecuación 4, d_H es el diámetro hidrodinámico, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad y D es el coeficiente de difusión (define el movimiento Browniano de las partículas en un solvente particular). Asimismo, el d_H es el tamaño de una esfera dura hipotético que se difunde a la misma velocidad que la partícula o molécula que está siendo medida.⁵⁸ En la práctica, las partículas o macromoléculas en solución son no esféricas, dinámicas y solvatadas (cubierta por una capa de hidratación). Por lo tanto, el diámetro calculado a partir de las propiedades de difusión de las partículas será indicativo del tamaño aparente de la partícula dinámica hidratada o partícula solvatada. Asimismo, el d_H depende del tamaño de la partícula (parte interna), de la estructura de la superficie y del tipo y concentración de iones en el medio.^{58,59}

Por lo tanto, cuando el rayo de luz es incidido sobre la muestra, a un ángulo fijo o ángulos múltiples, se origina una luz dispersada cuya fluctuación de su intensidad representa el movimiento al azar de las moléculas. Asimismo, esta luz dispersada es registrada como fotones en un detector fotomultiplicador (Figura 24).⁵⁸

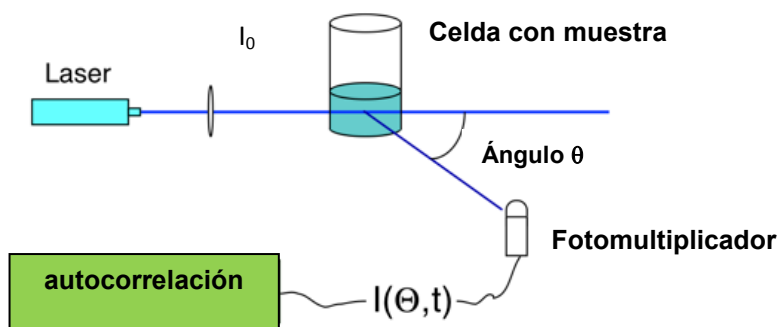


Figura 24. Principio del análisis de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). *Adaptada de la referencia 60*

En la Figura 24, I_0 es la intensidad de la luz incidente e I_θ es la intensidad de luz dispersada en función del tiempo.³⁴

Por otro lado, el índice de polidispersidad es una medida adimensional de la amplitud de la distribución del tamaño de las partículas (describe el ancho de la distribución Gaussiana) calculado a partir del método de Transformación de Laplace o análisis acumulativo a un ángulo de dispersión establecido. El análisis acumulativo es un método simple de análisis de la función de autocorrelación de la intensidad generada por el experimento DLS.^{59,61} La curva de correlación son los datos medidos en DLS y es una función de decaimiento simple y suave para una dispersión de un solo tamaño de la partícula, además cuando la curva de correlación se ajusta a una función exponencial, el coeficiente de difusión (D) puede ser calculado, el cual es proporcional al tiempo de vida del decaimiento exponencial.⁵⁹

Asimismo, si se asume la población de un solo tamaño de partículas siguiendo la distribución Gaussiana, el índice de polidispersidad está relacionado con la desviación estándar (σ) de la distribución Gaussiana hipotética de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PDI = \sigma^2 / Z_D^2 \quad \dots\dots\dots \text{(Ecuación 5)}$$

Donde: Z_D es el radio hidrodinámico promedio de varias partículas y σ es la desviación estándar. Por otro lado, la polidispersidad generalmente calculado por el software del equipo se calcula a partir de la ecuación 5 y se conoce como polidispersidad absoluta, mientras que el % de polidispersidad o polidispersidad relativa se calcula con la siguiente ecuación.⁶²

$$\% \text{ Polidispersidad} = (PDI)^{1/2} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{(Ecuación 6)}$$

En DLS las distribuciones del tamaño siempre tendrán un grado de polidispersidad a pesar de que la muestra consiste de un analito muy monodisperso. En general, cuando el % de polidispersidad es menor a 20 % las muestras son consideradas monodispersas (Figura 25).⁶²

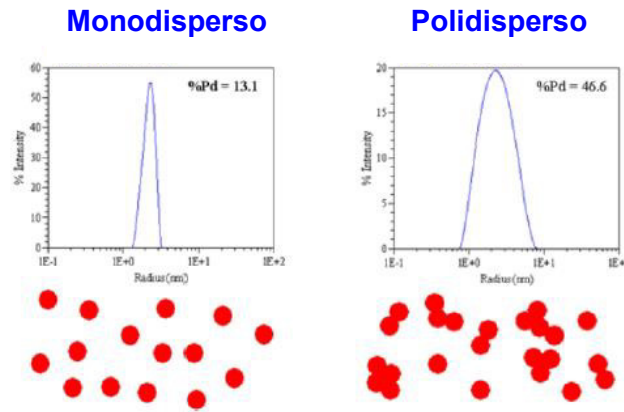


Figura 25. Distribución del tamaño monodisperso y polidisperso. *Adaptada de la referencia 62*

3.4.2.6. Difracción de rayos X (DRX)

Esta técnica es usada ampliamente en la determinación de los parámetros de las celdas unitarias de un material, en el análisis de las fases cristalinas en materiales sólidos, en la determinación de la orientación de los cristalitos en agregados policristalinos, en el tamaño de los cristalitos, en la cristalinidad de polímeros, entre otros.^{19, 63}

Los rayos X son una forma de radiación electromagnética con una longitud de onda entre 0,01 y 1 nm. Los fotones de los rayos X, a una determinada longitud de onda, colisionan con los electrones en los átomos y luego algunos fotones del rayo incidente serán deflectados lejos de la dirección de donde ellos viajaron originalmente (Figura 26). Estos rayos X dispersados son los que se miden en los experimentos de difracción y son los que llevan información acerca del rearrreglo atómico en los materiales.¹⁹

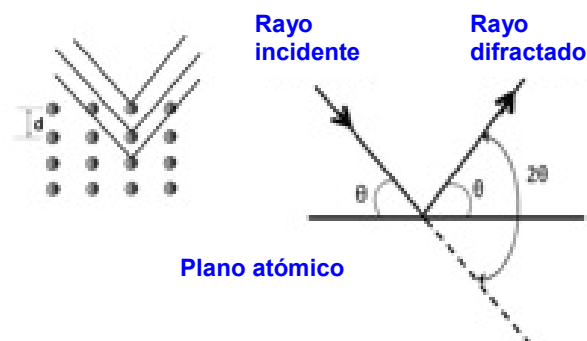


Figura 26. Principio de difracción. *Adaptada de la referencia 19*

En la Figura 26, θ es el ángulo de incidencia y d es la distancia entre los planos atómicos. Asimismo, la condición de difracción es establecida por la ley de Bragg (ecuación 7).¹⁹

$$D(\text{\AA}) = n\lambda / 2\sin\theta \quad \text{..... (Ecuación 7)}$$

En donde: $D(\text{\AA})$ es la distancia entre los planos atómicos, n es un número entero, λ es la longitud de onda de los rayos X y θ es el ángulo dispersado. Asimismo, existen dos métodos de difracción, el método de Laue en donde θ se mantiene constante y λ permanece variable y el método de difracción de polvo donde λ permanece constante y θ variable. En ambos métodos la intensidad de los rayos X dispersados es plotado contra el ángulo de difracción 2θ el cual es conocido como patrón de difracción del material. En este ploteo, los sólidos cristalinos muestran picos puntiagudos de máxima altura en su respectivo ángulo de difracción. Mientras que, en líquidos o sólidos amorfos existe una pérdida de periodicidad en la estructura originado una curva de rayos X dispersados con uno o dos máximos anchos. Asimismo, los gases no tienen una periodicidad estructural por lo tanto en la curva de rayos X dispersados no se observan picos.¹⁹

Por otro lado, en cuanto a la aplicación de difracción de rayos X en polímeros, esta técnica permite determinar el grado de cristalinidad, el tamaño de los cristalitas, la orientación cristalina, la identificación de polímeros semicristalinos y reconocimiento de fases cristalinas (polimorfismo).⁶³

Asimismo, las partes cristalinas originan picos puntiagudos y angostos de difracción, mientras que el componente amorfo origina picos muy anchos. La proporción entre estas dos intensidades pueden ser usadas para calcular la cantidad de cristalinidad en el material.¹⁹

Por lo tanto, el índice de cristalinidad (C.I.) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ C.I.} = [(I_{cr} - I_{am})/I_{cr}] \times 100 \quad \text{..... (Ecuación 8)}$$

Donde, I_{cr} es la intensidad máxima e I_{am} es la intensidad de la región amorfa.⁶⁴

Adicionalmente, el tamaño del cristal aparente (D_{ap}) se calcula con la ecuación de Scherrer (ecuación 9).

$$D_{ap} (\text{\AA}) = K\lambda / \beta_0 \cos\theta \quad \dots\dots\dots (\text{Ecuaci3n 9})$$

Donde, β_0 (en radianes) es la mitad del ancho del pico de reflexi3n relacionado al plano cristalogr3fico hkl , K es una constante que indica la perfecci3n del cristalito; λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X y θ es la mitad del 3ngulo de reflexi3n del plano hkl .⁶⁴ Asimismo, cuando la mitad del ancho del pico de reflexi3n son grandes corresponde a cristalitos peque1os pero cuando son angostos corresponde a cristalitos grandes.⁶³

3.4.2.7. Espectrometría de masas por Ionizaci3n Electrospray (ESI/MS)

La t3cnica de ionizaci3n por electrospray (ESI), ionizaci3n por electronebulizaci3n, es una t3cnica suave de ionizaci3n por cargas m3ltiples porque generalmente no ocurre fragmentaci3n del analito debido a que este retiene muy baja energía residual durante la ionizaci3n. La t3cnica ESI/MS es empleada, por ejemplo, para producir iones en fase gaseosa de macrom3lculas t3rmicamente l3biles, mol3culas org3nicas polares, mol3culas inorg3nicas y complejos metal-org3nico.⁶⁵

El espectr3metro ESI/MS est3 compuesto de tres componentes b3sicos: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector, donde el analizador de masas y el detector se encuentran sometidos a un alto vacío (Figura 27). La fuente de iones genera iones en fase gas, mientras que el analizador de masas separa a los iones de acuerdo a la relaci3n m/z . Estos iones separados son transportados al sistema detector para medir su concentraci3n y los resultados son presentados en un cuadro llamado espectro de masas.⁶⁵

En la Figura 28, se observa el mecanismo de la ionizaci3n electrospray, el cual se inicia cuando una soluci3n diluida del analito es inyectada a un capilar de acero inoxidable. Luego, un voltaje muy alto (2 a 6 kV) es aplicado entre la punta de este capilar y del capilar calentado entre 100 a 300 °C. Este fuerte campo el3ctrico causa la dispersi3n de la soluci3n de la muestra en un aerosol de gotas altamente cargadas. Asimismo, se produce una mejor nebulizaci3n por la presencia del gas seco N_2 que fluye alrededor del capilar. Luego, con la ayuda de este gas ocurre una evaporaci3n repetida del solvente de las gotas cargadas hasta alcanzar el punto l3mite de Rayleigh. En este punto ocurre la explosi3n Coulomb donde las gotas iniciales se desintegran en gotas mucho m3s peque1as (conteniendo únicamente una mol3cula de analito) con

una relación m/z más altas que las gotas iniciales. Estas pequeñas gotas al entrar en contacto con el capilar caliente (100 a 300 °C) conduce a una desolvatación completa formándose iones del analito en fase gaseosa, los cuales poseen baja energía interna entrando así al analizador de masas donde los diferentes tipos de iones son separados de acuerdo a la relación m/z y transportados, finalmente, al detector.⁶⁵

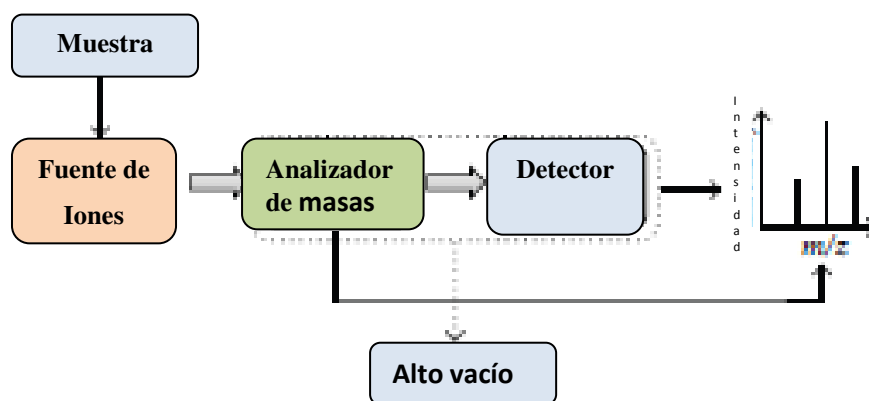


Figura 27. Componentes básicos del espectrómetro ESI/MS. *Adaptada de la referencia 65*

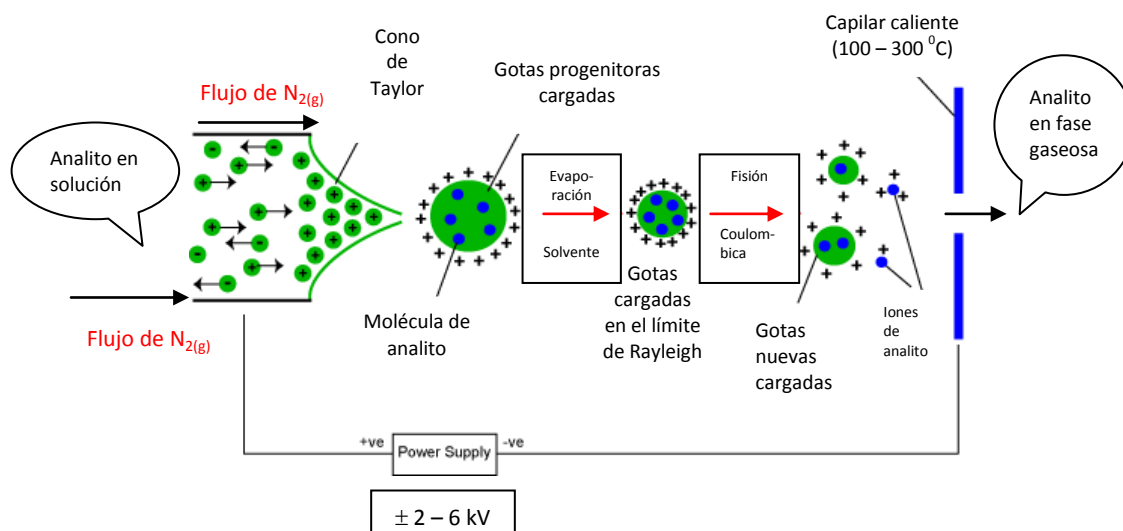


Figura 28. Representación esquemática de la fuente de iones ESI. *Adaptada de la referencia 66*

Por otro lado, cabe mencionar que si el voltaje aplicado al capilar es positivo, será en modo positivo donde las gotas llevarán carga positiva, siendo finalmente los iones o

aductos del analito positivos tales como $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$, mientras que si un voltaje negativo es aplicado, será en el modo negativo y las gotas llevarán carga negativa formándose iones negativos del analito como $[M-H]^-$.⁶⁵

Por otro lado, algunos detectores de masas son híbridos, los cuales son contruidos combinando diferentes tipos de analizadores de masas. Entre ellos se encuentra Q-TOF (cuadrupolo - tiempo de vuelo), el cual posee un filtro de masa cuadrupolo el cual atrae a los iones del analito, siendo los iones de masa incrementada que pasan a la celda de colisión, donde ocurre la fragmentación, originando un espectro de masa de escaneo completo. En el analizador de masas TOF, los iones son acelerados a una energía cinética constante y pasan a través de una región libre, donde estos iones adquieren una velocidad característica, la cual es proporcional a la raíz cuadrada de su relación masa-carga (m/z), los iones llegan al detector y son separados en tiempo. La alta sensibilidad y velocidad de escaneo del analizador TOF permite que el espectro sea generado a varias energías de colisión para cada ion precursor seleccionado.⁶⁷

4. ANTECEDENTES

Actualmente existen trabajos reportados sobre nanopartículas de isoniazida encapsulada en biopolímeros como el complejo interpolimérico quitosano-tripolifosfato (TPP)⁴, poli n-butilcianoacrilato², poliisobutilcianoacrilato², poliácido láctico⁸, complejo interpolimérico alginato-quitosano^{21,27}, copolímero polietilenglicol-poliácido aspártico (PEG-PASP)^{23, 68}, copolímero poliácido láctico-co-poliácido glicólico (PLGA)^{22,69,70,71}, copolímero poliácido láctico-co-poliácido glicólico funcionalizado con lectina⁷², y el tribloque PLGA-PEG-PLGA²⁴. Por otro lado, se han patentado trabajos sobre encapsulamiento de isoniazida en tamaño micro empleando los polímeros polivinilpirrolidona, ftalato de acetato de polivinilo, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de poliestireno, ftalato de acetato de celulosa y polímeros de ácido metacrílico.^{73,74}

Los métodos de encapsulamiento empleados en estos trabajos fueron por gelación ionotrópica^{4,21,27}, secado por atomización⁴, nanoemulsión múltiple^{22,69,70,71,72}, formación de micelas por condensación^{23,68} y doble emulsión²⁴. Asimismo, empleando la técnica de nanoemulsión múltiple se obtuvieron partículas de tamaño en el rango de 186 - 290 nm, mientras que por gelación ionotrópica se obtuvo 250 - 450 nm (quitosano-TPP) y

por doble emulsión y por formación de micelas por condensación se obtuvieron 150 - 400 nm y 84,2 nm, respectivamente.

El tamaño de las nanopartículas obtenido, con los métodos mencionados anteriormente, es mayor a 80 nm porque los parámetros del proceso como pH, concentración de las soluciones, orden de adición de los reactivos, temperatura, relación polímero/droga²⁹, concentración del surfactante, tiempo de sonicación⁷⁴, tal vez no fueron los más apropiados para obtener partículas de menor tamaño.

Por otro lado, el encapsulamiento de la droga en estudio con cada uno de los polímeros mencionados anteriormente dio resultados de actividad biológica más efectivas en comparación con la droga libre. Asimismo, el porcentaje de encapsulamiento empleando la técnica de nanoemulsión múltiple fue 64 - 67 %, ^{22,69,70,71,72} mientras que con la técnica de gelación ionotrópica : quitosano-TPP fue 9 – 14 % ⁴ y quitosano – alginato fue 70 – 90 % ²¹. Además, el porcentaje de encapsulamiento empleando la técnica doble emulsión fue 6,4 - 8,9 % ²⁴ y empleando la técnica por formación de micelas por condensación fue 65 % ^{23,68}.

Por lo tanto, el % de eficiencia de encapsulamiento de la droga obtenido de los métodos mencionados anteriormente, se encuentran en un rango de 9 a 90 %, cuyo valor depende de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de la droga y del método de preparación.^{15,31} Este valor obtenido se puede incrementar al variar los vectores que fueron empleados en su preparación incluyendo pKa y polaridad de la droga, tamaño y la superficie de carga de las nanoesferas, concentración de la droga en medio acuoso, la relación polímero/droga, concentración del surfactante, tiempo de sonicación.^{15,75}

En la preparación de nanopartículas de quitosano existen métodos reportados como gelación ionotrópica, microemulsión, evaporación del solvente, secado por atomización, coacervación, emulsificación, difusión del solvente.^{18, 31} Siendo, el proceso de gelación ionotrópica el más simple llevándose a cabo bajo condiciones suaves donde no se incluye el paso de emulsificación ni el empleo de solventes orgánicos, minimizando de esta manera la inactivación de las drogas encapsuladas.^{31,76} Mientras que los demás procesos como la microemulsión, evaporación del solvente, coacervación, emulsificación del solvente y difusión del

solvente involucra el uso de solventes orgánicos, trayendo como desventaja su difícil eliminación y el gran consumo de tiempo en los pasos de los lavados.

Por otro lado, el proceso de gelación ionotrópica presentaría un inconveniente durante la ultracentrifugación de la muestra a partir del cual se debe trabajar con el pellet, sin embargo, si no se emplea una adecuada frecuencia (revolución por minuto) una parte de la muestra quedaría en el sobrenadante resultando valores de rendimiento y porcentaje de encapsulamiento no exactos.

5. DISEÑO Y SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-POLIÁCIDO ASPÁRTICO CONTENIENDO ISONIAZIDA

5.1 Diseño

La terapia actual de la tuberculosis involucra la administración continua y frecuente de dosis de múltiples drogas entre ellas la isoniazida la cual es rápidamente absorbida después de la administración oral y rápidamente metabolizada en el tracto gastrointestinal en productos inactivos como acetilhidrazida, diacetilhidrazida, hidracina y N-acetilisoniazida.⁷⁷ Por lo tanto, permaneciendo en los sitios objetivo por corto tiempo (tiempo de vida biológico corto de $3,1 \pm 1,1$ horas) necesitando que sea administrado una vez al día por un periodo de seis meses.⁷⁶ Este problema y, asimismo, los efectos colaterales adversos de la droga en estudio podrían solucionarse al formular a está dentro de un sistema de liberación controlada, sostenida, pulsátil, lenta, extendida y prolongada basado en nanopartículas.^{17,78} Esta liberación modificada se logra generalmente por encapsulación, la cual involucra el uso de polímeros naturales y sintéticos como vehículos o transportadores.⁷⁸

En esta tesis se ha seleccionado a la isoniazida porque exhibe todas las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas para la liberación sostenida requerida.⁷⁶ Esta droga es menos permeable a través del estómago que las demás drogas antituberculosis. En la forma protonada a pH ácido ($pK_a = 2$) es principalmente absorbido a través del intestino.⁷⁹

Por otro lado, en base a los antecedentes de este trabajo (capítulo anterior) se plantea la síntesis de un nuevo conjugado de isoniazida con el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, con la finalidad de sintetizar partículas de menor tamaño

a 80 nm, lo que podría influir positivamente en el porcentaje de encapsulamiento de la isoniazida y en la eficiencia de la droga encapsulada en el tratamiento de la TBC.

El complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico seleccionado en este trabajo, sintetizado por gelación ionotrópica por interacción de los grupos NH_3^+ del quitosano y los grupos carboxilato COO^- del poliácido aspártico (Figura 29), debe actuar como vehículo de la sustancia activa, en este caso isoniazida, por medio de los fluidos corporales de fase acuosa protegiéndolo de los agentes biológicos externos capaces de degradarlo, aumentando así su tiempo de vida media de circulación en la sangre lo suficiente para propiciar una toma efectiva por los tejidos de los órganos de interés, lo que le permite ejercer eficientemente su acción terapéutica. Sin embargo, no debe permanecer luego por mucho tiempo, sino ser eliminado para minimizar efectos tóxicos.³⁶

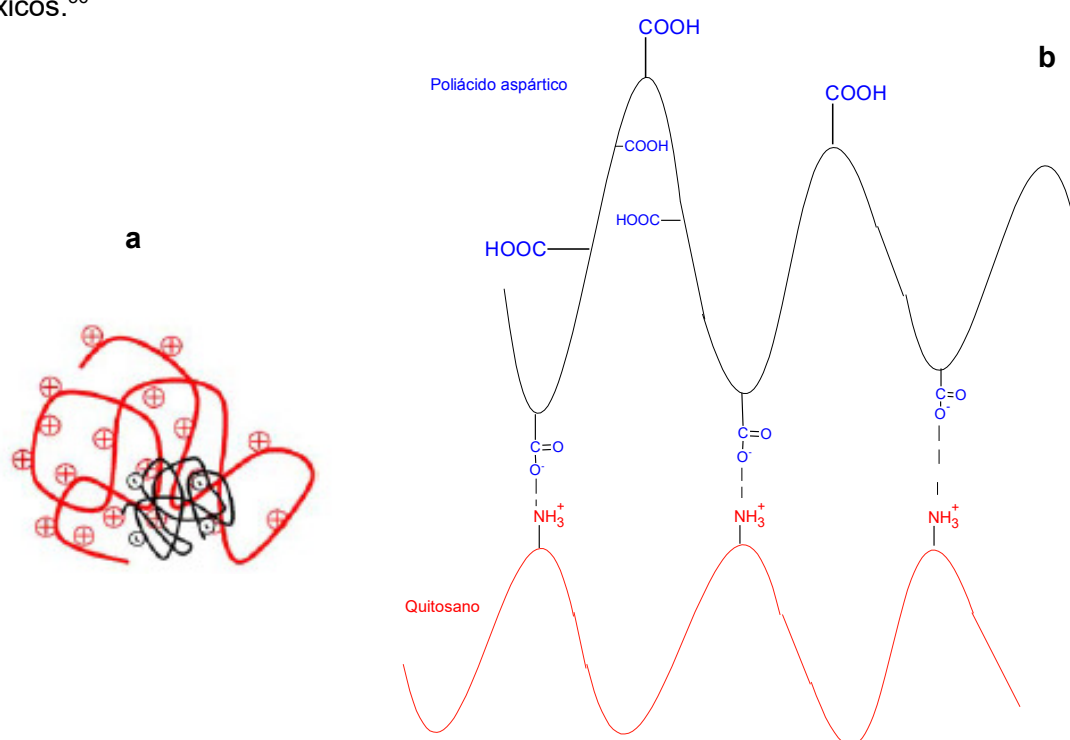


Figura 29. Complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico (a) e interacción iónica entre quitosano y poliácido aspártico (b). *Adaptada de las referencias 29 y 80*

Asimismo, el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico reúne las características de ser biodegradable, biocompatible y no tóxico. Además, este complejo interpolimérico será sintetizado por gelación ionotrópica a partir de los polímeros quitosano y poliácido aspártico. Por lo tanto, a continuación se describirán a los biopolímeros involucrados en la síntesis del complejo interpolimérico.

Quitosano: Es un polisacárido derivado de la quitina natural, segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa que se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos e insectos, en la pared celular de algunos hongos, algas verdes, levaduras, protozoarios y en los moluscos.⁸¹ El quitosano se obtiene por desacetilación de las unidades de N-acetilglucosamina de la quitina, generalmente, por hidrólisis bajo condiciones alcalinas y con temperatura (método convencional).^{27,81} Asimismo, cuando el grado de desacetilación está por debajo de 60 % la quitina se convierte en quitosano y raramente la desacetilación es completada.⁸¹

El quitosano consiste en unidades D-glucosamina y N-acetilglucosamina conectados vía enlaces glicosídicos β -1-4. Es un polisacárido que posee una estructura lineal, conformación helicoidal, donde las unidades D-glucosamina y N-acetilglucosamina se encuentran distribuidas al azar^{81,82} (Figura 30).

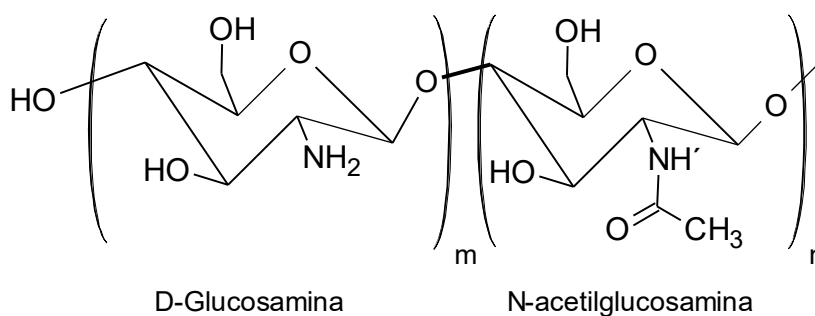


Figura 30. Estructura del Quitosano

Asimismo, la quitina y por consecuencia el quitosano producidos de varias fuentes se diferencian ligeramente entre sí, existiendo en tres formas α , β y γ . Siendo, α la forma más común, le sigue β y el menos común de los tres es la γ . Las formas α y β se diferencian en la estructura cristalina donde las cadenas en la forma β poseen un arreglo paralelo con fuerzas intermoleculares relativamente débiles, mientras que en la forma α las cadenas están alineadas de una manera antiparalela con fuerzas intermoleculares de enlaces puente de hidrógeno más fuerte (Figura 31). Por lo tanto, la forma β es más soluble, reactiva y absorbente que la forma α . Asimismo, en una desacetilación alcalina la estructura cristalina de β -quitina es rápidamente destruida a través del proceso a diferencia de la forma alfa.^{82,83}

Mientras que, la forma β -quitina o β -quitosano se derivan de moluscos, α -quitina o α -quitosano son obtenidos, predominantemente, del caparazón de crustáceos, langostas, cangrejo, camarón. A pesar que β -quitina o β -quitosano es menos abundante que α -quitina o α -quitosano, su fácil obtención a condiciones suaves y su afinidad a solventes como ácidos orgánicos y agua le confiere un alto valor potencial y comercial.^{82,83}

Por lo tanto, el proceso de desacetilación de β -quitina de moluscos se desarrolla bajo condiciones relativamente suaves usando un medio alcalino a bajas temperaturas a diferencia de la desacetilación α -quitina de crustáceos, lo cual indica que β -quitosano posee una mayor afinidad a varios solventes y una reactividad más alta que el α -quitosano.^{82,83}

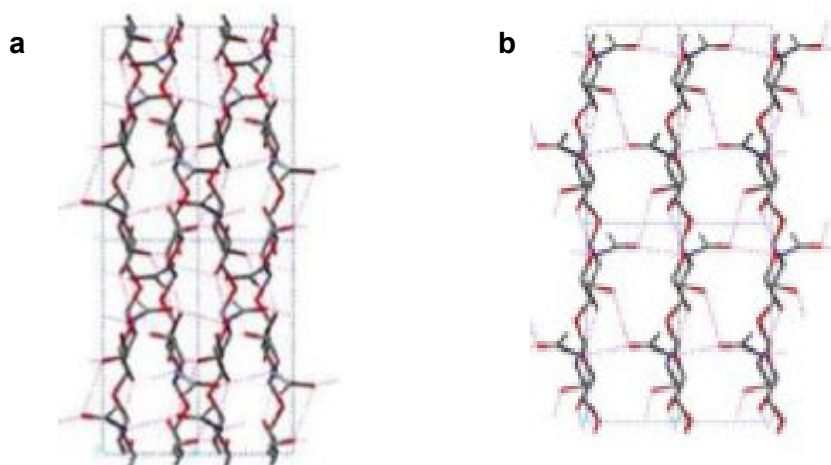


Figura 31. Estructura del α -quitosano (a) y β -quitosano (b)⁸²

Por otro lado, de acuerdo a un estudio de análisis SEM, se determinó que la morfología de las partículas β -quitina consta de fibras largas de diámetros pequeños, mientras que α -quitina posee la forma de escamas rectangulares y de un grosor más delgado.⁸⁴

El quitosano, polímero natural, se caracteriza por ser no tóxico, semicristalino, biodegradable y biocompatible. Posee buenas propiedades mucoadhesivas debido a su carga positiva lo cual incrementa la adhesión a la mucosa y, por lo tanto, el tiempo de contacto para lograr y/o facilitar la absorción de la droga. Además, posee las propiedades de permeabilidad de membrana y respuesta a estímulos.^{4,31,76,81,85}

Por lo tanto, para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de interés, en el presente trabajo se empleará β -quitosano extraído de la pota (*Dosidicus gigas*) por el método convencional, cuya extracción consiste en la descalcificación con una solución diluida de HCl a temperatura ambiente, siguiendo con la desproteinización con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura ambiente y finalmente ocurre la desacetilación con una solución acuosa concentrada de NaOH 50 % a altas temperaturas (90 °C).²⁷

Además, el quitosano es un polication cuya densidad de carga depende del grado de acetilación y el pH. Asimismo, las cadenas del quitosano son capaces de interactuar por interacciones electrostáticas con moléculas cargadas negativamente como TPP, alginato, poliácido aspártico (ver Figura 29), por el método de gelación ionotrópica.⁸¹

En cuanto a la aplicación del quitosano se usa en el tratamiento de aguas residuales, en cosméticos, agricultura, cicatrización, suplementos dietéticos, oftalmología, emulsificantes en alimentos, en actividad antioxidante, antibactericida, anticancerígeno, antiviral, anticoagulante, fungicida, inmunoestimulante, agente hemostático, modulador de la función del riñón, bloqueador de grasas, adhesivo-resistente al agua.⁸⁶

En años recientes, el sistema de liberación de drogas ha sido una de las mejores aplicaciones del quitosano y sus derivados. Entre los principales factores que permite que se use al quitosano como vehículo en el sistema de liberación de drogas es su biodegradabilidad y el hecho que puede ser fácilmente metabolizado por ciertas enzimas humanas, especialmente lisozimas y quitinasas.^{81,84} Sin embargo, la velocidad de degradación depende del peso molecular y del grado de acetilación.⁸⁷

Poliácido aspártico o sus sales: Es un nuevo tipo de biopolímero biodegradable, inocuo, amigable ambientalmente, reconocido como material verde y ampliamente aplicado en las áreas de agricultura, medicina, petróleo y tratamiento de agua.⁸¹

El poliácido aspártico es un poliaminoácido que consiste en unidades de aminoácidos unidos mediante enlace amida. Es un polímero lineal y flexible que contiene grupos carboxílicos hidrofílicos, lo cual le confiere el carácter hidrosoluble.³⁶ Este polímero con grupos carboxílicos cargados negativamente le permite actuar como agente quelante

con diferentes iones metálicos y también le permite interactuar por gelación ionotrópica con polímeros cargados positivamente como quitosano (ver Figura 29).

Las unidades que conforman al poliácido aspártico pueden variar en el tipo de enlace α y β o en la configuración D y L. En la presente tesis se trabajará con α,β -poli(D,L-ácido aspártico) (Figura 32) y la ventaja de usar a este poliaminoácido sintético se basa en que este, a diferencia de su contraparte sintético/natural poli(L-ácido aspártico) que sufre una degradación demasiado rápida como consecuencia de la actividad de la enzima α -peptidasa presente en el plasma sanguíneo, es mucho más resistente a dicha degradación gracias a la presencia de grupos CH de configuración D y unidades β -péptidos en la cadena principal que son inertes al ataque de dicha enzima.^{36,88}

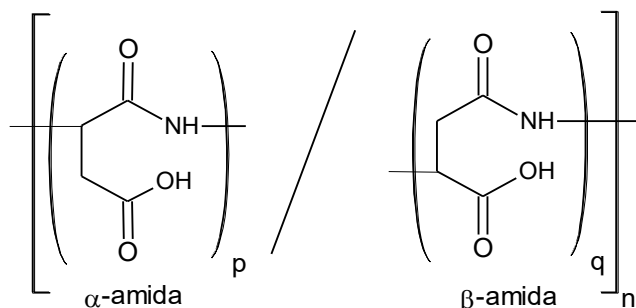


Figura 32. Estructura del α,β -poli(DL-ácido aspártico)

Asimismo, el hecho de que el polímero en cuestión sea un poliaminoácido sintético, permite un control adecuado de su peso molecular, dado que los naturales generalmente poseen un peso molecular muy alto, mayor que 200 kDa y son particularmente polidispersos ($M_w / M_n > 2$).^{20,36}

Por otro lado, el poliácido aspártico es un polímero muy versátil y ofrece muchas posibilidades de derivatización. Entre los numerosos polímeros derivados se encuentran: el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico⁸⁵, las poliaspartamidas⁸⁸, las micelas poliméricas (poliácido aspártico-bloque-poli-etilenglicol^{89,90}, poliácido aspártico-bloque-polioxazolin⁹¹), hidrogeles de poliácido aspártico⁹² y reticulaciones solubles de poliácido aspártico⁹³.

Por último, el conjugado polímero-droga a desarrollarse en esta tesis se basa en nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico conteniendo isoniazida el cual se desarrollará por interacción de la droga con el complejo

interpolimérico quitosano-poliácido aspártico mediante enlaces puentes de hidrógeno entre los grupos N-H de la isoniazida y los grupos N-H y O-H del complejo interpolimérico. Asimismo, para lograr la encapsulación de la droga en el complejo interpolimérico ésta, primero, será dispersada en el polímero aniónico (poliaspartato de sodio) y luego por interacción electrostática (gelación ionotrópica) con el polication (quitosano) se formarán las nanopartículas del encapsulamiento a un pH apropiado.

5.2. Síntesis

5.2.1. Síntesis de la polisuccinimida

La polisuccinimida (PSI) se sintetizará por policondensación térmica del monómero DL-ácido aspártico, catalizada por ácido fosfórico H_3PO_4 85 % a 170 °C por tres horas de reacción con ciertas modificaciones presentadas en la literatura.^{36,94,95}

La polimerización ocurre en dos etapas basadas en reacciones de condensación. Primero, una reacción intermolecular, catalizada por H_3PO_4 , entre dos moléculas de ácido aspártico donde un grupo amino de una de las moléculas con el hidroxilo del grupo carboxílico de la otra molécula reaccionan para formar el enlace amida con eliminación de una molécula de agua (Figura 33-a), mientras que la segunda etapa es intramolecular la cual involucra la reacción del nitrógeno amida con el hidroxilo del grupo carboxílico conduciendo a la formación del anillo succinimida con la eliminación de otra molécula de agua (Figura 33-b).³⁶

La polisuccinimida se caracterizará por IR, RMN y su peso molecular se determinará por viscosimetría capilar.

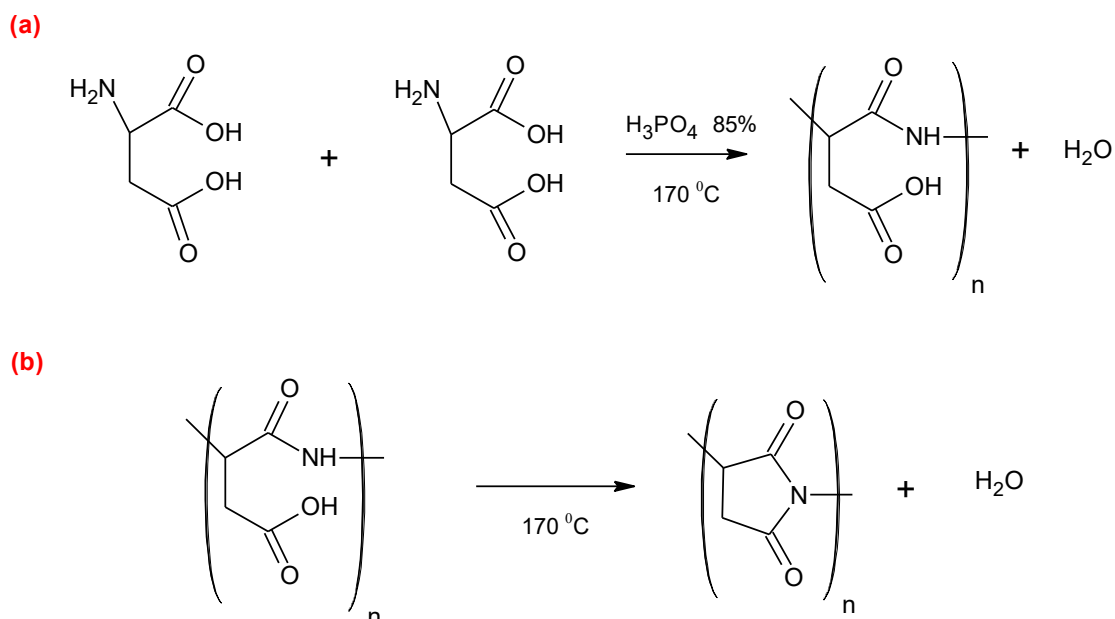


Figura 33. Síntesis de la polisuccinimida (PSI)

5.2.2. Síntesis del poliácido aspártico y su sal de sodio

El poliácido aspártico se sintetizará a partir de la hidrólisis básica del PSI, modificación del método de Shinoda y colaboradores.⁹⁶ La hidrólisis se realizará con NaOH 2 M a pH 11,5 – 12,5 bajo agitación por tres horas y a temperatura ambiente. Luego, la solución será acidificada con HCl 20 % a pH 3 para su posterior precipitación en metanol.

Por otro lado, para la obtención del poliaspartato de sodio, el poliácido aspártico será disuelto en agua, basificado a pH 12,5 y finalmente liofilizado.

Los productos serán caracterizados por IR, RMN, SEM, DRX y el peso molecular será determinado por Dispersión de Luz Estática (SLS)

En la Figura 34 se presenta la reacción de síntesis del poliaspartato de sodio a partir de la hidrólisis alcalina de la polisuccinimida formándose las unidades α -amida y β -amida a partir de la apertura del anillo succinimida.

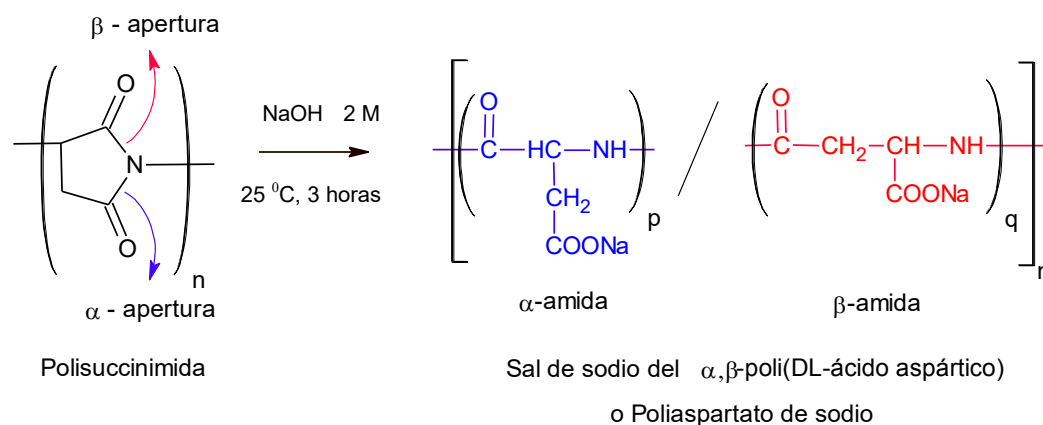


Figura 34. Síntesis del Poliaspartato de sodio

5.2.3. Preparación de quitosanos de diferentes pesos moleculares

Quitosanos, obtenidos de la pota, de diferentes pesos moleculares se obtendrán por hidrólisis ácida con CH_3COOH 1 % y serán caracterizados por IR, RMN, SEM, DRX y GPC.

5.2.4. Síntesis del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico

En este trabajo las nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico en solución coloidal se sintetizarán empleando la técnica de gelación ionotrópica donde soluciones acuosas ácidas de quitosano de diferente concentración a pH 2,5 se combinarán con una solución acuosa de poliaspartato de sodio de concentración definida a pH 7 bajo agitación constante por una hora y a temperatura ambiente empleando diferentes relaciones en peso de quitosano/poliaspartato de sodio. En la Figura 35 se muestra un esquema representativo de esta síntesis.

Las soluciones coloidales serán caracterizadas por DLS, TEM y AFM.

Asimismo, las muestras sólidas obtenidas de las soluciones coloidales anteriores se caracterizarán por IR, DRX, SEM y UV-Visible.

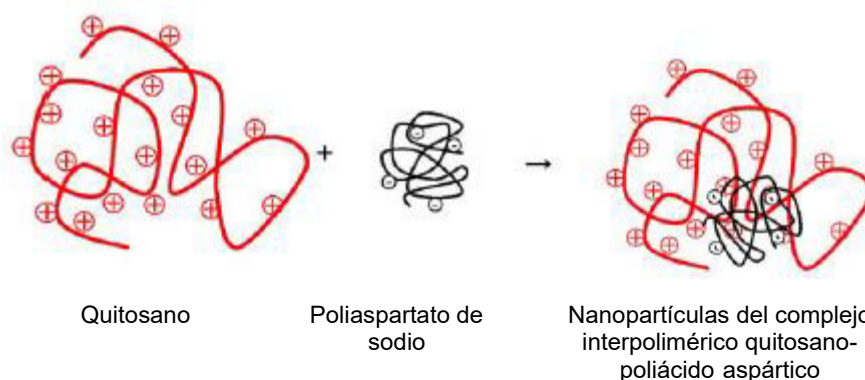


Figura 35. Esquema de la formación de nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico²⁷

5.2.5. Síntesis de nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico conteniendo isoniazida

En la presente tesis las nanopartículas del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico conteniendo isoniazida en solución coloidal se sintetizarán empleando la técnica de gelación ionotrópica donde la solución acuosa ácida de quitosano a pH 2,5 se combinará con la solución acuosa de poliaspartato de sodio pH 7, la cual contiene la droga, bajo agitación constante por una hora y a temperatura ambiente empleando diferentes relaciones en peso de droga/quitosano.

Las soluciones coloidales serán caracterizadas por DLS, TEM y AFM.

Asimismo, las muestras sólidas obtenidas de las soluciones coloidales anteriores se caracterizarán por IR, DRX, SEM, STEM, CCF, ESI/MS y UV-Visible.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Equipos y Reactivos

Equipos

Los espectros UV-Visible fueron medidos en un espectrofotómetro Thermo Scientific, Modelo Helios γ.

Los espectros IR por ATR fueron medidos en el espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer, Modelo Spectrum 100 en la Universidad de Charlotte en Estados Unidos y los

espectros IR por pastilla de KBr fueron medidos en el espectrofotómetro FT-IR Shimadzu, Modelo Affinity-1, de la Universidad de São Paulo en Brasil.

Los espectros RMN han sido medidos en el espectrómetro Bruker Avance 400, Modelo UltraShield™, de la Universidad Joseph Fourier de Grenoble en Francia; en el espectrómetro Bruker Avance 500, Modelo UltraShield™, de la Universidad de Carnegie Mellon en Estados Unidos; en el espectrómetro Bruker Avance III 400, Modelo UltraShield™ de la Universidad de Connecticut en Estados Unidos; en el espectrómetro Bruker Avance HD III 800, Modelo UltraShield™, de la Universidad de Maryland en Estados Unidos y en el espectrómetro JEOL, Modelo ECA 300, de la Universidad de Carolina del Norte en Charlotte en Estados Unidos

La ultracentrifugación fue realizada en la centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed, Modelo RC2-B, en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El secado de las muestras a 20 °C se realizó en la incubadora Memmert, Modelo UNE 200, del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La liofilización de las muestras fue realizada en el liofilizador RISICOR, Modelo LE 300, de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El peso molecular de las muestras de quitosano fueron determinados por GPC empleando la columna TSK Gel G5000PW (polimetacrilato hidroxilado, tamaño de partícula promedio 17 µm y tamaño de poro promedio 1000 Å), el detector de índice de refracción Varian Pro Star, Modelo 350 y el dispersor de luz de ángulo múltiple Dawn Helios-II, modelo WH202, de la Universidad de Memphis en Estados Unidos.

El peso molecular del poliaspartato de sodio fue determinado por SLS en el Zetasizer Nano Malvern, Modelo ZS, del Instituto de Petru Poni de Química Macromolecular en Rumania.

Los análisis DLS de las soluciones coloidales fueron determinados en el equipo analizador de tamaño de partícula Brookhaven, Modelo 90 Plus, de la Facultad de

Química de la Universidad Nacional de Ingeniería. Las lecturas se realizaron a 25 °C y a un ángulo de 90 °.

Los análisis AFM de las soluciones coloidales fueron determinados por modo de contacto en el equipo Asylum Research, Modelo MFP-3D, del Laboratorio Nacional de Alta Tecnología (LANOTEC) en Costa Rica. Se colocó 5 µL de la solución sobre una lámina de mica. Se dejó secar y luego se realizó la medición a 25 °C y a una velocidad de escaneo de 0,56 Hz.

Los análisis TEM fueron determinados en el microscopio Philips, Modelo CM-200, a 200 kV del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) en México. A la solución coloidal se agregó ácido fosfotúngstico. Luego, una gota de esta solución se depositó sobre una rejilla de cobre con cubierta de carbón con hoyos. Se secó a temperatura ambiente y se procedió a observar en el microscopio.

Los análisis STEM fueron determinados en el microscopio de emisión electrónica JEOL, Modelo JSM-7401F, a 30 kV del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) en México.

Los análisis SEM fueron determinados en el equipo Philips, Modelo 505 con el adquisidor de imágenes ADDAII, con Scandium Soft Imaging System, del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA) en Argentina. Se empleó un potencial de trabajo de 25 kV, soportando las muestras sobre grafito y metalizándolas con oro. Por otro lado, también se empleó el equipo LEO, Modelo 440, con el detector Oxford de la Universidad de São Paulo en Brasil. Se usó un potencial de trabajo de 20 kV, soportando las muestras sobre grafito y metalizándolas con oro.

Los análisis DRX de las muestras en polvo fueron determinados en el difractómetro Siemens, Modelo D-5005, con radiación $\text{CuK}\alpha$ de la Facultad de Química de la Universidad de São Paulo en Brasil. Los patrones de difracción fueron registrados en el rango $2\theta = 2^\circ - 80^\circ$, escaneado a 2° min^{-1} .

Los análisis ESI/MS fueron determinados en el instrumento Waters Q-TOF, Modelo Ultima ESI, de la Universidad de Illinois en Estados Unidos. Las muestras fueron disueltas en 0,1 mL de HCl 1 M y sometidas a vórtice. Luego, fueron centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron separados y diluidos empleando

la relación 1:25 para ser analizadas por ESI. El tiempo máximo del análisis fue de una hora.

Reactivos y Solventes

Se emplearon D,L- ácido aspártico 99 % y ácido fosfórico 85 % de Sigma-Aldrich; Isoniazida 99 % de Acros Organics; ácido isonicotínico de Fisher Scientific; ácido clorhídrico fumante 37 % y las placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck; hidróxido de sodio 98 % de Movilab, ácido acético glacial ACS y cloroformo de Fermont; N,N-dimetilformamida y acetona p.a. de J.T Baker; metanol y acetato de etilo de De Tedia.

6.2. Metodología

6.2.1. Quitosano

6.2.1.1. Obtención de quitosanos de diferente pesos moleculares

Primeramente se preparó quitosano a partir de las plumas de pota (*Dosidicus gigas*) por el método convencional (desmineralización por tratamiento ácido (HCl 2 M), seguido de la desproteinización (NaOH 2 M) y finalmente desacetilación (NaOH 50 %, 110 °C). El quitosano obtenido (Q1) fue secado a 40 °C. Q1 fue purificado previamente a la hidrólisis ácida: se disolvió 2,61 g de Q1 en 392 mL de ácido acético 1 % v/v a 73 °C bajo agitación por dos horas. Se filtró, y el filtrado fue llevado a pH 6 para precipitar el quitosano. Se filtró nuevamente y se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó a 40 °C. Este quitosano fue denominado Q1-0 y fue caracterizado por RMN-¹H en D₂O/DCl a 80 °C.

De otro lado, se disolvió 10,00 g de Q1 en 1000 mL de CH₃COOH 1 % v/v a temperatura ambiente bajo agitación por dos horas. Se filtró y se guardó a temperatura ambiente. Después de cada semana se separó 200 mL de la solución y se precipitó con NaOH 2 M. A cada muestra de quitosano se filtró, se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó a 40 °C obteniéndose las muestras Q1-1, Q1-2, Q1-3 y Q1-4, correspondientes a la primera, segunda, tercera y cuarta semana de hidrólisis, respectivamente. Las muestras fueron caracterizadas por RMN-¹H en D₂O/DCl a 80 °C. Adicionalmente, Q1-4 fue caracterizada por IR (ATR).

Quitosano de pota, de un segundo lote, (Q2) fue disuelto en ácido acético 1 % v/v (10 g en 1500 mL) a 73 °C bajo agitación por dos horas. Se filtró y se guardó a temperatura ambiente por cuatro semanas. Después de cuatro semanas se precipitó la solución con NaOH 2 M (Q2-4). Se filtró, se lavó con agua destilada hasta pH neutro y se secó a 40 °C. Se caracterizó por RMN-¹H en D₂O/DCl a 80 °C, IR (ATR), DRX y SEM.

6.2.1.2. Grado de acetilación determinado por RMN-¹H

Las muestras de quitosano fueron analizadas por RMN en D₂O/DCl a una concentración de 4 a 6 mg/mL, encontrándose el pH en el rango de 3,5 a 4. Algunas muestras de quitosano fueron analizadas por RMN en CD₃COONa/CD₃COOD a una concentración de 4 a 10 mg/mL a un pH de 3,7. Las lecturas se realizaron a 80 °C.

6.2.1.3. Peso molecular determinado por GPC

Se prepararon soluciones de quitosano de concentración 1 mg/mL en CH₃COONa 0,1 M / CH₃COOH 0,2 M. El índice diferencial de refracción fue 0,1630 mL/g. Asimismo, la fase móvil estuvo constituida por CH₃COONa 0,1 M / CH₃COOH 0,2 M y la velocidad de flujo fue 0,5 mg/mL.

6.2.2. Polisuccinimida (PSI)

6.2.2.1 Síntesis

Se mezcló 10 g de DL-ácido aspártico (0,075 moles) y 10 g de H₃PO₄ 85 % (0,102 moles), a 170 °C, en un balón de 500 mL (conectado a un equipo de condensación con trampa Dean-Stark) calentado previamente a 170 °C por 10 minutos. En seguida, se aplicó vacío y después de 1,5 horas se suspendió la reacción y, en caliente, se agregó 100 mL de DMF bajo atmósfera de nitrógeno por un tiempo de 10 minutos. Luego, para completar la disolución del polímero, se dejó en agitación de un día para otro a temperatura ambiente. La solución obtenida se filtró y se purificó por precipitación donde se vertió gota a gota la solución polimérica en 500 mL de agua bajo agitación y a temperatura ambiente. Se obtuvo un precipitado blanco el cual fue filtrado y enjuagado con agua hasta pH neutro. Se secó a 110 °C y se molió, obteniéndose 7,1 g de un sólido crema (rendimiento: 97 %). El producto fue caracterizado por RMN-¹H en DMSO e IR (ATR).

6.2.2.2. Peso molecular determinado por viscosimetría capilar

Se preparó 500 mL de una solución de LiCl 0,1 M en DMF. Luego, con esta solución se prepararon cuatro soluciones de polisuccinimida : 0,002; 0,004; 0,006 y 0,008 g/mL.

Empleando el viscosímetro de Ubbelohde, se determinó, a 25 °C, el tiempo de flujo, t_0 , y t del solvente LiCl 0,1 M y de las soluciones de polisuccinimida de diferentes concentraciones, respectivamente.

6.2.3. Poliacido aspártico

Síntesis

A 6,0 g de polisuccinimida se agregó gota a gota, bajo agitación a temperatura ambiente, una solución acuosa de NaOH 2 M hasta pH 11,5. Luego de tres horas de reacción se llevó a pH 3 con HCl 20 %. Se precipitó gota a gota en 100 mL de metanol. Luego, se filtró bajo vacío y se lavó con el mismo solvente. Se secó a 40 °C por 24 horas. Se obtuvo un sólido higroscópico de aspecto gomoso. A este producto se le agregó 20 mL de cloroformo, se agitó por una hora a temperatura ambiente, se filtró bajo vacío, se lavó con el mismo solvente y se secó a 40 °C por 48 horas. El producto obtenido fue molido y secado bajo vacío a 50 °C por 13 horas. Se obtuvo 6,1 g de un producto de color crema (rendimiento: 86 %). El producto fue caracterizado por IR (ATR).

6.2.4. Poliaspartato de sodio

6.2.4.1. Síntesis

Se disolvió 6,0 g del poliacido aspártico en 50 mL de agua. Se llevó a pH 12,5 con NaOH 2 M bajo agitación y a temperatura ambiente. Se filtró y la solución resultante se liofilizó por 24 horas. Se obtuvo 4,5 g de un sólido de color blanco (rendimiento: 62 %). El producto fue caracterizado por RMN-¹H en D₂O, RMN-¹³C en D₂O, IR (ATR), DRX y SEM.

6.2.4.2. Determinación del Peso Molecular por SLS

Se prepararon diferentes concentraciones de soluciones acuosas de poliaspartato 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 % en medio acuoso, el pH de cada solución fue 6,8. Las soluciones fueron leídas a una temperatura de 25 °C y con un ángulo de 90 °C.

6.2.5. Complejo interpolimérico de Quitosano - Poliacido aspártico (Q-PAA)

6.2.5.1. Solución Coloidal

La síntesis de las soluciones coloidales del complejo interpolimérico de Quitosano-poliácido aspártico se llevaron a cabo agregando la solución de poliaspartato de sodio sobre la solución de quitosano, a diferentes proporciones $W_{\text{Quitosano}} / W_{\text{Poliaspartato}}$ (Tabla 1), bajo agitación por 1 hora y a temperatura ambiente. El pH inicial de las soluciones de quitosano y poliaspartato fueron 2,5 y 7, respectivamente, y el pH final de la solución coloidal fue 4 sin necesidad de ajustar este pH con una solución ácida o básica. Luego, las soluciones coloidales fueron centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 1 hora, obteniéndose las soluciones coloidales sobrenadantes (Q-PAA1-11, Tabla 1). Siendo estas soluciones caracterizadas por DLS. Los análisis AFM y TEM fueron realizados a Q-PAA10.

Tabla 1. Síntesis de soluciones coloidales del Q-PAA

Código de la solución coloidal del Q-PAA	Relación en peso WQuitosano / WPoliaspartato (mg/mg)	Quitosano*				Poliaspartato*	
		Código	Peso (mg)	Volumen CH ₃ COOH 1 % v/v (mL)	Concentración %	Peso (mg)	Volumen de la solución (mL)
Q-PAA1	2,87 : 1	Q1-0	8,6	27,5	0,0313	3	10
Q-PAA2	7,17 : 1	Q1-1	8,6	27,5	0,0313	1,2	4
Q-PAA3	5,73 : 1	Q1-2	8,6	27,5	0,0313	1,5	5
Q-PAA4	4,78 : 1	Q1-3	8,6	27,5	0,0313	1,8	6
Q-PAA5	2,39 : 1	Q1-4	8,6	27,5	0,0313	3,6	12
Q-PAA6	2,87 : 1		8,6	27,5	0,0313	3	10
Q-PAA7	6,94 : 1		25	80,8	0,0309	3,6	12
Q-PAA8	20,83 : 1		75	50	0,15	3,6	12
Q-PAA9	2,87 : 1	Q2	8,6	27,5	0,0313	3	10
Q-PAA10	6,94 : 1	Q2-4	25	80,8	0,0309	3,6	12
Q-PAA11	20,83 : 1		75	50	0,15	3,6	12

**La concentración de la solución de poliaspartato fue 0,03 %.*

**El pH de las soluciones de quitosano y poliaspartato fue 2,5 y 7, respectivamente. El pH final de la solución coloidal formada fue 4.*

En la Tabla 2 se indica las diluciones de las soluciones coloidales Q-PAA1-11 que fueron requeridas para el análisis DLS.

Tabla 2. Diluciones de las soluciones coloidales del Q-PAA para el análisis DLS

Código de la solución coloidal del Q-PAA	Dilución para las lecturas por DLS Vmuestra/Vagua (mL/mL)
Q-PAA1	5/5
Q-PAA2	
Q-PAA3	2,5/7,5
Q-PAA4	5/5
Q-PAA5	2,5/7,5
Q-PAA6	5/5
Q-PAA7	
Q-PAA8	
Q-PAA9	
Q-PAA10	
Q-PAA11	

6.2.5.2. Partículas sólidas (Secado a 40 °C)

Se preparó la solución coloidal Q-PAA10 - Tabla 1 empleando cinco veces la cantidad de los reactivos (125 mg de quitosano en 404 mL de CH₃COOH 1 % y 18 mg de poliaspartato en 60 mL de agua). La solución coloidal sobrenadante fue secada en placas petri a 40 °C. El producto fue lavado con agua y secado, nuevamente, a 40 °C. Se obtuvo 59,1 mg de un producto de color beige (Q-PAA10s) (rendimiento: 41 %). Se caracterizó por IR (KBr), SEM, DRX y UV-Visible.

Asimismo, se pesó 1,9 mg del sólido beige y se resuspendió en 1,5 mL de agua con un tiempo de sonicación de 30 minutos para su posterior análisis por DLS.

6.2.5.3. Liofilización

Las soluciones coloidales del complejo interpolimérico para el proceso de liofilización (Q-PAA/L1-6) se prepararon con las condiciones presentadas en la Tabla 3, a mayor

escala, bajo agitación a temperatura ambiente. Luego, las soluciones fueron liofilizadas, obteniéndose productos de color blanco, físicamente parecido a una tela, los cuales fueron lavados con abundante agua y secados a 40 °C. Se obtuvieron productos de color crema los cuales fueron molidos y caracterizados por SEM. El análisis IR (ATR) fue realizado a Q-PAA/L4.

Tabla 3. Síntesis de soluciones coloidales del Q-PAA para el proceso de liofilización

Código de la solución coloidal Q-PAA para el proceso de liofilización	Relación en peso WQuitosano / WPoliáspartato (g/g)	Quitosano*			Poliáspartato*	
		Código	Peso (g)	Volumen CH ₃ COOH 1 % v/v (mL)	Peso (g)	Volumen de la solución (mL)
Q-PAA/L1	2,83 : 1	Q1-0	0,425	1416,3	0,15	500
Q-PAA/L2	7,08 : 1	Q1-1	0,531	1770	0,075	500
Q-PAA/L3	5,67 : 1	Q1-2	0,425	1416	0,075	250
Q-PAA/L4	4,72 : 1	Q1-3	0,354	1180,3	0,075	250
Q-PAA/L5	2,36 : 1	Q1-4	0,3542	1180,7	0,15	250
Q-PAA/L6	2,83 : 1	Q2	0,425	1375,1	0,15	500

**La concentración de las soluciones de quitosano y poliáspartato fue 0,03 %.*

**El pH de las soluciones de quitosano y poliáspartato fue 2,5 y 7, respectivamente. El pH final de la solución coloidal formada fue 4.*

6.2.6. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano - Poliácido aspártico (I/Q-PAA)

6.2.6.1. Solución coloidal

Se realizaron cuatro ensayos preliminares donde las relaciones en peso de la isoniazida/quitosano (mg/mg), empleando Q2-4, son 6 : 1; 1 : 1; 0,7 : 1 y 0,5 : 1. En la Tabla 4 se observan las condiciones de reacción manteniéndose constante la relación

en peso de quitosano/poliaspartato (mg/mg). Las soluciones coloidales preparadas fueron centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 1 hora obteniéndose las soluciones sobrenadantes (I/Q-PAA1-4) las cuales fueron caracterizadas por DLS. El análisis AFM fue realizado a I/Q-PAA2-4, mientras que el análisis TEM a I/Q-PAA4.

Asimismo, durante la síntesis de I/Q-PAA1-4, la droga isoniazida fue disuelta en la solución de poliaspartato la cual fue agregada gota a gota a la solución de quitosano bajo agitación a temperatura ambiente.

Por otro lado, para el análisis DLS de las soluciones coloidales I/Q-PAA1-4 se requirió la dilución 5/5 (volumen de muestra / volumen de agua, mL/mL).

Tabla 4. Ensayos de encapsulamiento de I/Q-PAA

Código de la solución coloidal de isoniazida encapsulada en Q-PAA	Relación en peso WQuitosano/ WPoliaspartato (mg/mg)	Quitosano* (Q2-4)		Poliaspartato*		Isoniazida	Wisoniazida/ WQuitosano (mg/mg)
		Peso (mg)	Volumen (mL)	Peso (mg)	Volumen (mL)	Peso (mg)	
I/Q-PAA1	6,94 : 1	154,9	500	22,3	74,3	929,5	6 : 1
I/Q-PAA2		25	80,8	3,6	12	25	1 : 1
I/Q-PAA3		25	80,8	3,6	12	17,5	0,7 : 1
I/Q-PAA4		25	80,8	3,6	12	12,5	0,5 : 1

**La concentración de las soluciones de quitosano y poliaspartato fue 0,03 %.*

**El pH de las soluciones de quitosano y poliaspartato fue 2,5 y 7, respectivamente.
El pH final de la solución coloidal formada fue 4.*

6.2.6.2. Partículas sólidas (Secado a 20 y 40 °C)

Se prepararon cuatro nuevas soluciones coloidales de I/Q-PAA con la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) 6 : 1; 1 : 1 (duplicado) y 0,5 : 1 (Tabla 5) empleando las

mismas condiciones de síntesis pH, temperatura, concentraciones de las soluciones de quitosano y poliaspartato referente a la Tabla 4. Sin embargo, para las relaciones 6 : 1 y 0,5 : 1 se empleó mayor cantidad de quitosano, poliaspartato e isoniazida (Tabla 5).

Tabla 5. Soluciones coloidales I/Q-PAA para su posterior secado a 20 y 40 °C.

Código de la solución coloidal de isoniazida encapsulada en Q-PAA	W Isoniazida/ W Quitosano (mg/mg)	Peso Isoniazida (mg)	Quitosano (Q2-4)		Poliaspartato		Temperatura de secado (°C)
			Peso (mg)	Volumen CH ₃ COOH 1 % v/v (mL)	Peso (mg)	Volumen de la solución (mL)	
I/Q-PAA1	6 : 1	929,5	154,9	500	22,3	74,3	20
I/Q-PAA2	1 : 1	50	50	161,6	7,2	24	
(duplicado)	1 : 1	50	50	161,6	7,2	24	40
I/Q-PAA4	0,5 : 1	77,4	154,9	500	22,3	74,3	20

Las soluciones coloidales sobrenadantes fueron secadas en placas petri a 20 °C en una incubadora por dos semanas, mientras que el duplicado I/Q-PAA2 fue secado a 40 °C. Los cuatro productos obtenidos fueron lavados con agua por centrifugación y se secaron nuevamente a las temperaturas iniciales de secado 20 y 40 °C, según corresponda el caso. Con respecto a I/Q-PAA1 se obtuvo 115,3 mg de un producto de color verde amarillo (I/Q-PAA1s) (rendimiento : 10 %). Con respecto a I/Q-PAA2, empleando el secado a 40 °C, se obtuvo 20,7 mg de un producto de color verde negruzco (I/Q-PAA2s₄₀) (rendimiento : 19 %), mientras que con el secado a 20 °C se obtuvo 25 mg de un producto verde amarillo (I/Q-PAA2s₂₀) (rendimiento : 23 %). Con respecto a I/Q-PAA4 se obtuvo 132,5 mg de un producto de color verde amarillo (I/Q-PAA4s) (rendimiento : 52 %). El producto I/Q-PAA4s fue caracterizado por IR (KBr), DRX, SEM, STEM, ESI/MS, cromatografía en capa fina (CCF) y UV-Visible.

Asimismo, la cantidad de 1,9 mg de I/Q-PAA4s fue resuspendido en 1,5 mL de agua con un tiempo de sonicación de 30 minutos para su posterior análisis por DLS.

6.2.7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de isoniazida, ácido isonicotínico y del encapsulamiento I/Q-PAA4s

Isoniazida y ácido isonicotínico fueron disueltos en agua y en medio ácido : HCl 0,1 M y CH₃COOH 1 % para su análisis por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel 60 F₂₅₄. El análisis se desarrolló en el sistema de solvente acetato de etilo : metanol (7 : 3 v/v). Asimismo, el encapsulamiento I/Q-PAA4s fue disuelto en HCl 0,1 M y analizado por CCF empleando el mismo sistema de solvente.

6.2.8. Análisis UV-Visible

6.2.8.1. Isoniazida

Determinación de la longitud de onda de trabajo en medio acuoso y ácido

Se prepararon dos soluciones estándar de isoniazida 0,1 mM en agua y en HCl 0,1 M. Luego, se realizó un barrido UV-Visible de 200 a 800 nm de ambas soluciones estándar.

6.2.8.2. Ácido isonicotínico

Determinación de la longitud de onda en medio acuoso y ácido

Se prepararon dos soluciones estándar de ácido isonicotínico 0,1 mM en agua y en HCl 0,1 M. Luego, se realizó un barrido UV-Visible de 200 a 800 nm de ambas soluciones estándar.

6.2.8.3. Complejo interpolimérico Quitosano - Políácido aspártico

A 1,7 mg de Q-PAA10s, se agregó 5 mL de HCl 0,1 M y se sonicó por 10 minutos. Luego, se filtró y se realizó un barrido UV-Visible de 200 a 800 nm.

6.2.8.4. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Quitosano - Políácido aspártico

Identificación cualitativa de isoniazida

Se disolvió 10 mg de I/Q-PAA4s en 10 mL de HCl 0,1 M. Luego, se filtró y se realizó un barrido UV-Visible de 200 a 800 nm.

Determinación cuantitativa de isoniazida en el complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico.

Se preparó una solución estándar de isoniazida de 1 mM en HCl 0,1 M. A partir de esta solución, por dilución, se prepararon las soluciones de isoniazida de 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 y 0,025 mM. Empleando estas soluciones estándar se preparó la curva de calibración siendo la longitud de onda de trabajo 266,5 nm.

Luego, se disolvieron 10 mg de I/Q-PAA1s; I/Q-PAA2s₂₀ y I/Q-PAA4s (por duplicado) en 10 mL de HCl 0,1 M. Se filtraron y se leyeron por UV-Visible a 266,5 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Quitosano

7.1.1. Preparación

Las muestras de quitosano fueron depolimerizadas por hidrólisis ácida, con CH₃COOH, a través de una reacción SN1 del enlace glucosídico. En la Figura 36 se observa el posible mecanismo reportado en la literatura.⁹⁷

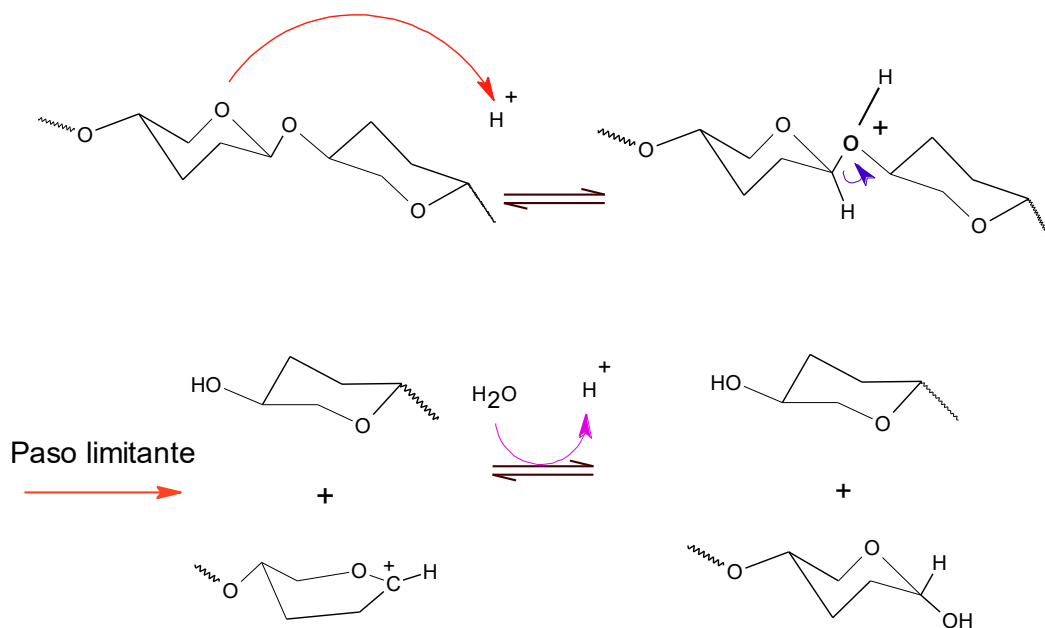


Figura 36. Posible mecanismo para la hidrólisis ácida del enlace glucosídico del quitosano.⁹⁷

Se observa que los iones H^+ protonan al oxígeno del enlace glucosídico. Luego, el oxígeno, para buscar su estabilidad, captura los electrones del enlace glucosídico que le mantenía unido a la otra unidad glucosamina o N-acetilglucosamina formándose de esta manera dos estructuras una estable en forma de silla y la otra unidad, inestable, en forma de bote cargado positivamente en el átomo de carbono. Luego, los iones HO^- del agua atacan al ion carbonio formándose finalmente la otra estructura estable en forma de silla.

7.1.2. Rendimiento de los quitosanos obtenidos por hidrólisis ácida de los quitosanos Q1 y Q2

En la Tabla 6 se observa el rendimiento de los quitosanos obtenidos de la hidrólisis ácida con CH_3COOH 1 % v/v de las muestras de quitosano Q1 y Q2.

Tabla 6. Rendimiento de los quitosanos obtenidos por hidrólisis ácida de los quitosanos Q1 y Q2.

Quitosano inicial (antes de la hidrólisis)		Temperatura de hidrólisis ácida con CH_3COOH 1 % v/v (°C)	Quitosano final (después de la hidrólisis)		Rendimiento %
Código	Peso (g)		Código	Peso (g)	
Q1	2,6134	73	Q1-0	0,8511	33
	2,5	ambiente	Q1-1	1,1642	47
	2,5		Q1-2	1,1334	45
	2,5		Q1-3	1,0647	43
	2,5		Q1-4	0,7956	32
Q2	10	73 (al inicio) y temperatura ambiente (durante 4 semanas)	Q2-4	8,51	85

El % de rendimiento para las muestras de quitosano obtenidas de Q1 (Q1-0 a Q1-4) es moderadamente bajo debido a la baja solubilidad de esta muestra. Durante la filtración se descartó gran parte de un material que correspondería a impurezas como quitina.

La muestra Q1 a pesar de haber sido disuelta a 73 °C fue poco soluble y gran parte del material fue descartado durante la filtración.

Por otro lado, Q2 fue más soluble que Q1 observándose durante la filtración de Q2-4 una mínima cantidad de residuo de impurezas presentando mayor porcentaje de rendimiento. Asimismo, Q2 por presentar una gran solubilidad es considerada como quitosano de la semana cero de hidrólisis porque no hubo necesidad de someterla a hidrólisis en dicho tiempo.

7.1.3. Caracterización

7.1.3.1. Espectroscopia Infrarroja

El espectro IR del quitosano nos confirma que se ha obtenido el producto de interés de acuerdo a lo reportado en la literatura.⁹⁸⁻¹¹²

En la Figura 37 se observa el espectro IR (ATR) de Q2-4. Se observa que la banda ancha a 3333 - 3299 cm^{-1} corresponde al estiramiento N-H del grupo amida y del grupo $-\text{NH}_2$, y al estiramiento O-H. El pico que aparece a 2862 cm^{-1} se asigna al estiramiento C-H del grupo CH_2 . En la zona de 2140 – 1918 cm^{-1} aparecen varias bandas de absorción de baja intensidad características del estiramiento N-H del grupo amino protonado (νNH_3^+). Los picos a 1737 y 1655 - 1647 cm^{-1} se asignan al estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, del C=O de la amida I. La absorción a 1574 cm^{-1} corresponde a la deformación N-H del grupo amino protonado (δNH_3^+), mientras que los picos entre 1563 - 1549 cm^{-1} pertenecen a la deformación N-H de la amida II. La presencia del pico de baja intensidad a 1454 cm^{-1} se asigna a la deformación C-H del anillo. Por otro lado, los picos 1409 y 1373 cm^{-1} pertenecen a la deformación asimétrica y simétrica del C-H del grupo CH_3 , respectivamente. Los dos picos de baja intensidad que aparecen a 1311 y 1272 - 1250 cm^{-1} se asignan al estiramiento C-N de la amida III y del grupo amino $-\text{C-NH}_2$, respectivamente. Las bandas de absorción entre 1149 a 1054 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace glucosídico $-\text{C-O-C-}$. Además, el pico de alta intensidad a 1023 cm^{-1} pertenece al

estiramiento C-O del esqueleto del anillo, mientras que la zona de absorción $1001 - 984 \text{ cm}^{-1}$ se asigna al estiramiento C-O del alcohol primario $-C-OH$. Los picos 892 y 654 cm^{-1} se asignan al estiramiento del anillo y al meneo N-H del grupo amino, respectivamente.

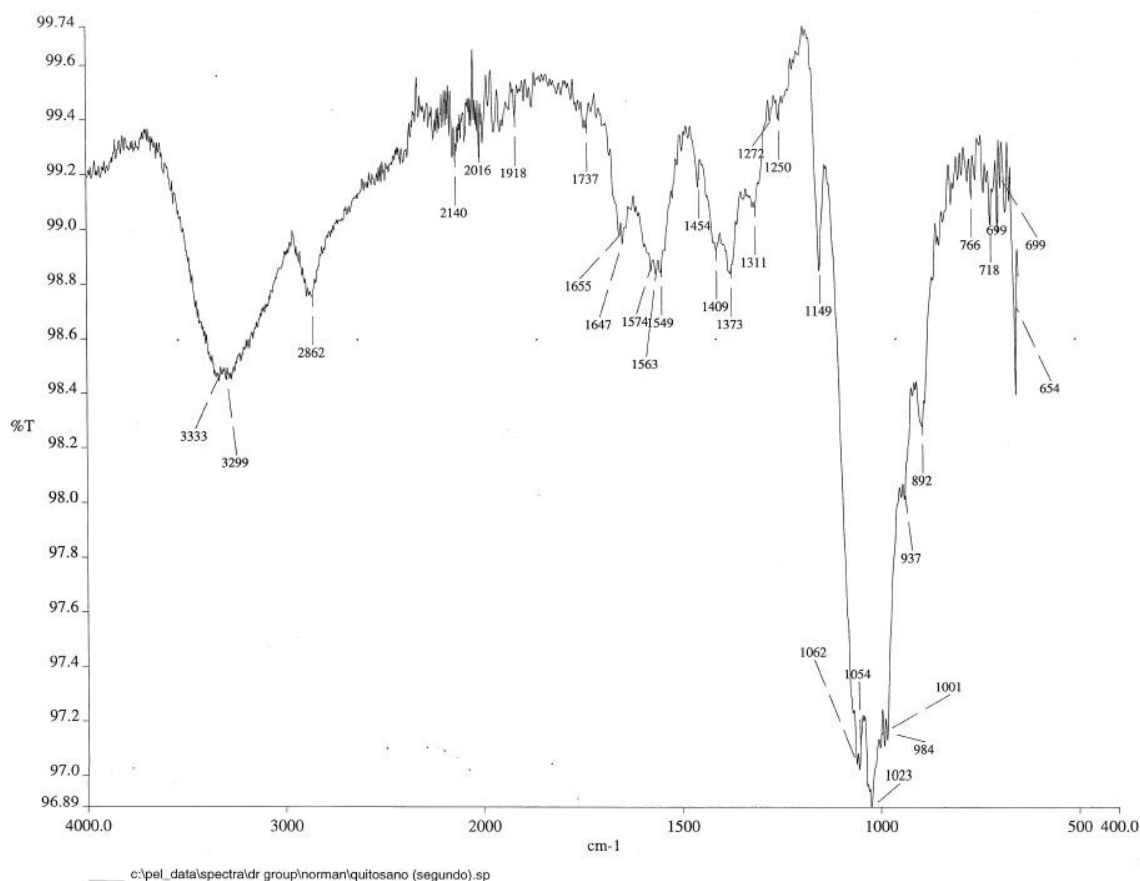


Figura 37. Espectro IR (ATR) del Quitosano (Q2-4)

7.1.3.2. Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros RMN- 1H de las muestras de quitosano del presente trabajo nos confirma, de acuerdo a lo reportado en la literatura^{113,114}, que se ha logrado obtener los productos de interés.

En la Figura 38 se observa el espectro RMN- 1H en D_2O/DCI a $80^\circ C$ de Q2. Los protones metileno del grupo acetilo son observados como una resonancia singulete a 2 ppm. El protón metino (H2) es visto también como una señal singulete a 3,05 ppm. Los protones H3, H4, H5, H6, H7 aparecen como un multiplete entre 3,3 – 3,9 ppm. Por otro lado, la señal del HDO aparece a 4,1 ppm. El protón H' del grupo N-acetilado

resuena a 4,5 ppm como una pequeña señal y el protón **H1** del -NH_2 es visto como una resonancia singlete a 4,8 ppm.

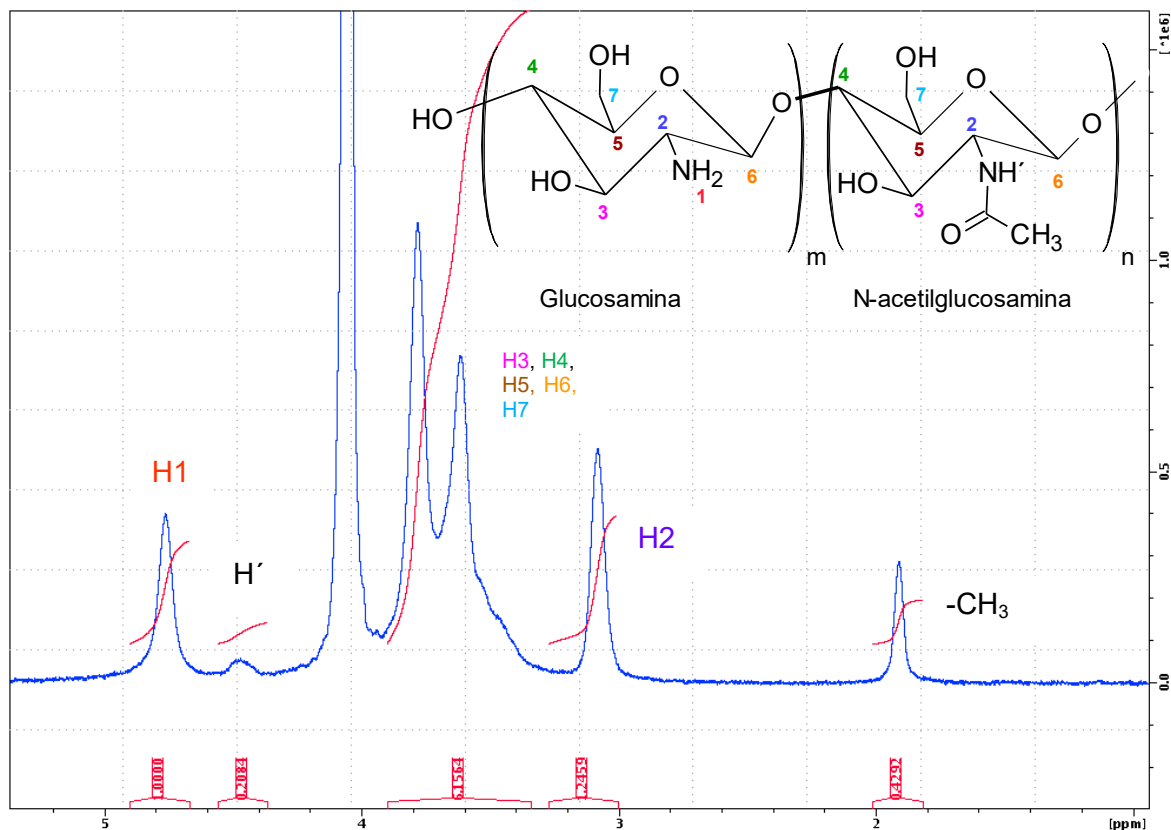


Figura 38. Espectro RMN- ^1H del Quitosano (Q2) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$

Por otro lado, en la Figura 39 se observa el espectro RMN- ^1H de Q1-1 en $\text{CD}_3\text{COONa}/\text{CD}_3\text{COOD}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$, con supresión de la señal del agua.

Los protones metileno del grupo acetilo son observados como una resonancia singlete a 2,51 ppm. El protón metino (**H2**) es visto también como una señal singlete a 3,46 ppm. Los protones **H3**, **H4**, **H5**, **H6**, **H7** aparecen como un multiplete entre 4,15 – 4,40 ppm. Por otro lado, la señal del -CD_3 del CD_3COOD aparece a 2,47 ppm. El protón **H'** del grupo N-acetilado resuena a 5,07 ppm como una pequeña señal y el protón **H1** del -NH_2 es visto como una resonancia singlete a 5,2 ppm.

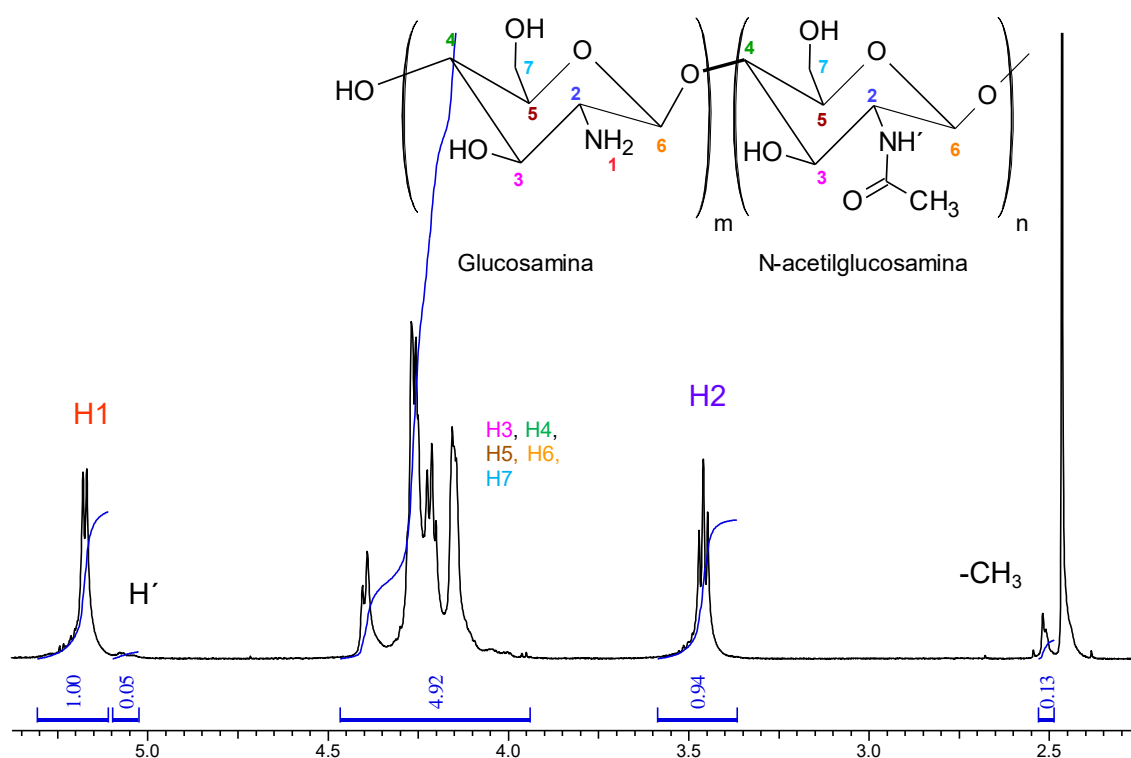


Figura 39. Espectro RMN- ^1H del Quitosano (Q1-1) en $\text{CD}_3\text{COONa}/\text{CD}_3\text{COOD}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$

7.1.3.3. Grado de acetilación

El grado de acetilación (GA) de las muestras de quitosano se obtuvo a partir de sus espectros RMN- ^1H en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$ (Figuras 40 y 41).

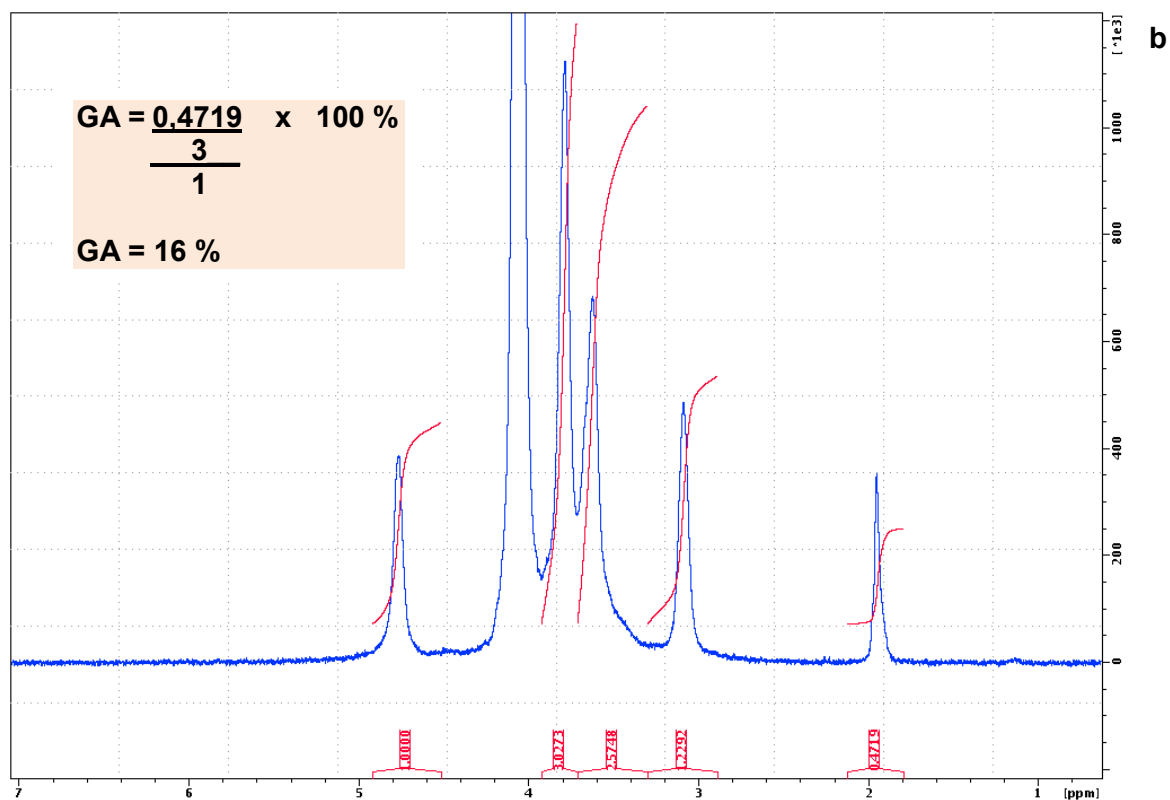
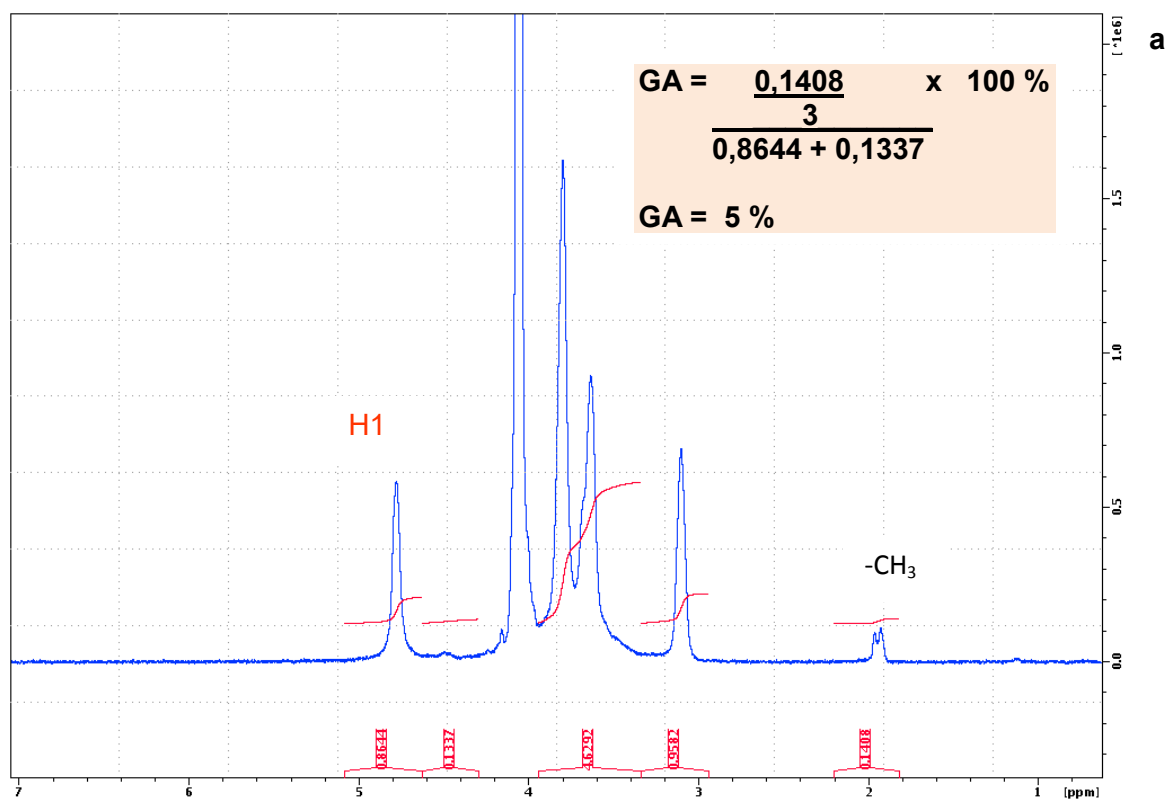
El cálculo del GA, mostrado en Tabla 7, se realizó dividiendo entre 3 la integral de los protones metilo del grupo acetoamida y a este valor entre la integral del protón **H1** de la unidad glucosamina por 100 %.

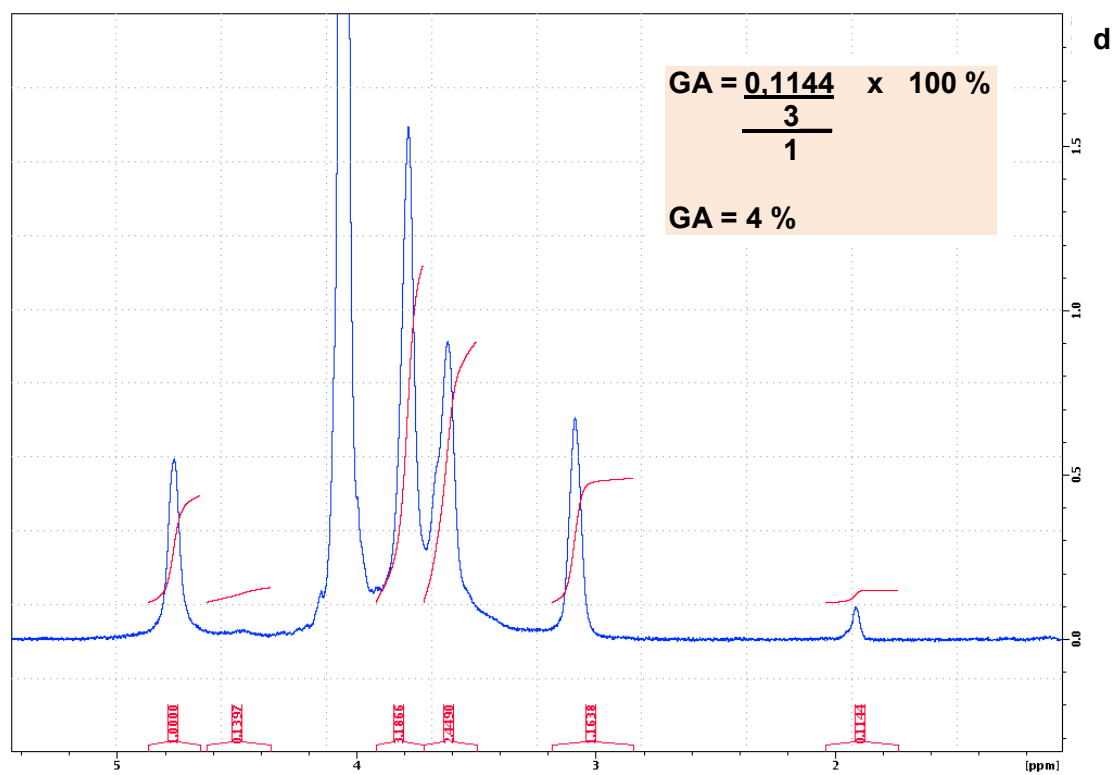
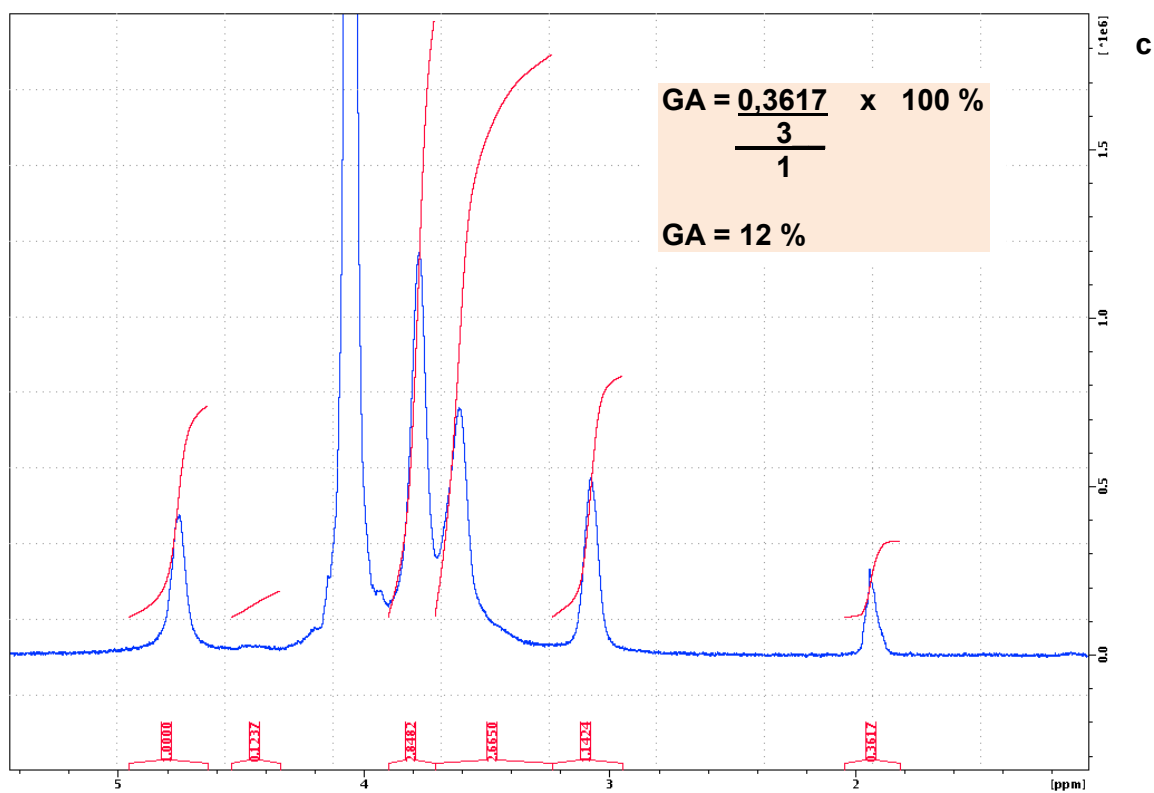
Adicionalmente, en la Tabla 7 se observa que para Q1-0 y Q2-4 el cálculo del GA se realizó dividiendo entre 3 la integral de los protones metilo del grupo acetoamida y a este valor entre la integral de la suma de los protones **H1** y **H'** de la unidad glucosamina y N-acetilglucosamina, respectivamente, debido al pequeño desdoblamiento que sufre el pico del protón metilo de la unidad acetilada de estas dos muestras de quitosano por causas de un problema en el ajuste de homogeneidad del campo magnético (shimming) originado por la baja solubilidad de las muestras y a la formación de burbujas durante las lecturas a $80\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 7. Grado de acetilación de las muestras de quitosano analizados por RMN-¹H en D₂O/DCI a 80 °C

Código del Quitosano	Temperatura de hidrólisis ácida con CH ₃ COOH 1 % v/v (°C)	Grado de acetilación	Grado de acetilación
		Integral CH ₃	Integral CH ₃
		3	3
		Integral H1	Integral (H1 + H')
		(GA)	(GA)
		%	%
Q1-0	73	-	5
Q1-1	ambiente	16	-
Q1-2		12	-
Q1-3		4	-
Q1-4		4	-
Q2	No hidrólisis	14	-
Q2-4	73 (al inicio) y temperatura ambiente (durante 4 semanas)	-	17

Se observa que Q1-0 contiene un grado de acetilación de 5 %, Q1-3 y Q1-4 poseen un grado de acetilación de 4 %, mientras que el grado de acetilación para Q1-1 y Q1-2 es 16 y 12 %, respectivamente, ver los espectros RMN-¹H en la Figura 40. Las causas de estos últimos valores, mayores al 4 – 5 %, podría deberse a problemas durante la lectura por RMN-¹H porque a una concentración de 4 a 6 mg/mL de estos polímeros poco solubles y expuestos a una temperatura de 80 °C se pudo originar burbujas que dificultaron las lecturas y por lo tanto una inexactitud de los resultados. Por otro lado, se descarta la posibilidad que durante la hidrólisis ácida de los quitosanos con ácido acético haya ocurrido una reacetilación del quitosano es decir que se haya formado una reacción de equilibrio entre el grupo amino del quitosano y el ácido acético porque este último solo actúa como solvente. La reacetilación hubiera sucedido en presencia de agentes de acetilación como por ejemplo anhídrido acético o cloruro de acilo como lo reporta la literatura.^{115,116}





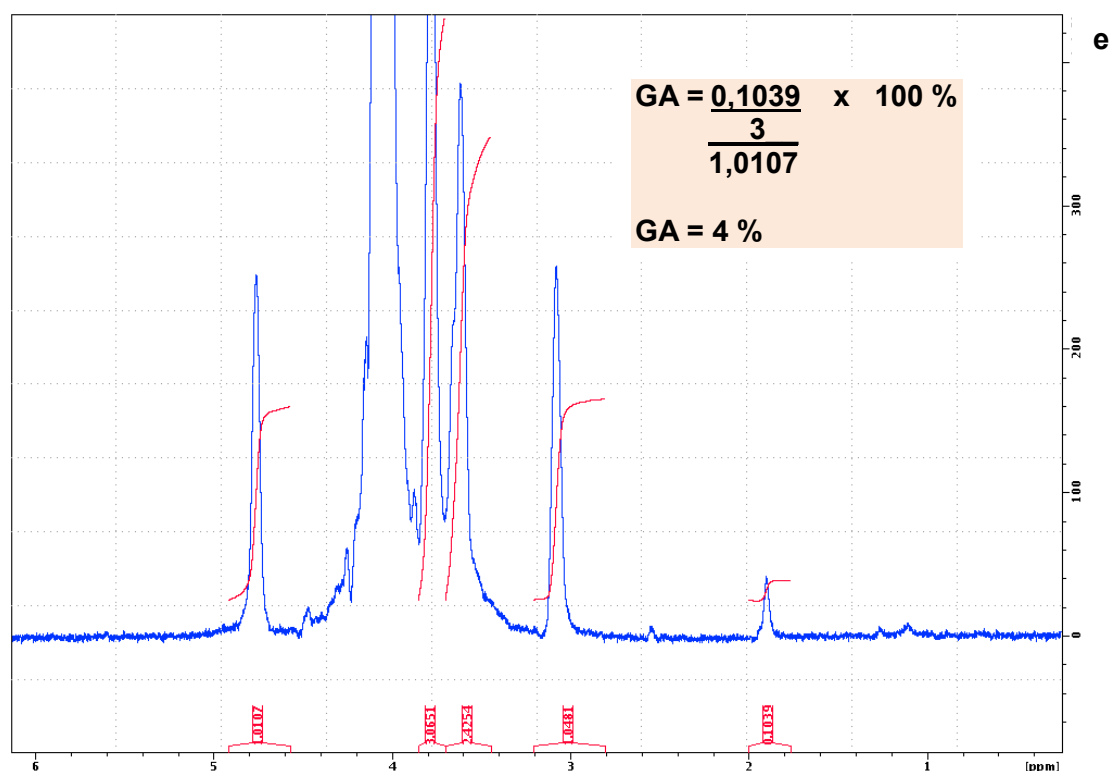


Figura 40. Espectros RMN- ^1H en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 80°C de Q1-0 (a), Q1-1 (b), Q1-2 (c), Q1-3 (d) y Q1-4 (e)

Por otro lado, en la Tabla 7 y Figura 41 se observa que el grado de acetilación para Q2 es 14 %, mientras que para Q2-4 es 17 % debido, posiblemente, a los problemas que ocurren durante la lectura por RMN- ^1H , mencionados anteriormente.

Asimismo, en la Figura 42 se presentan los espectros RMN- ^1H en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 80°C superpuestos de todas las muestras de quitosano. Se observa que la señal del protón metilo del grupo acetilo (CH_3) que resuena a 2 ppm se diferencia en todos los espectros de las diferentes muestras de quitosano.

Por lo tanto, en la Figura 43 se muestra la señal ampliada de este protón metilo. Se observa, con mayor claridad, el ligero desdoblamiento de la señal singulete del CH_3 del grupo acetilo para Q1-0 y Q2-4.

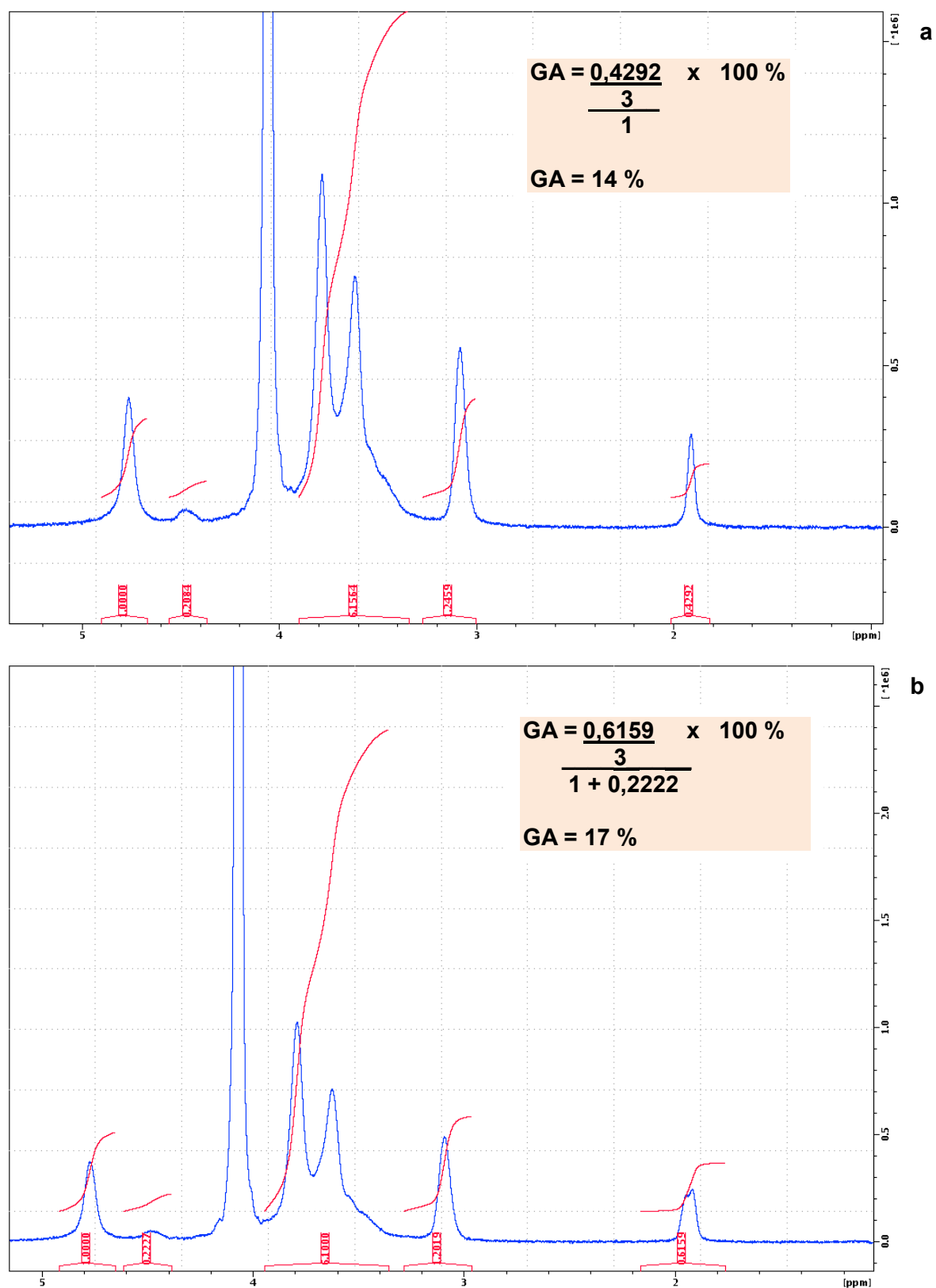


Figura 41. Espectros RMN- ^1H en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$ de Q2 (a) y Q2-4 (b)

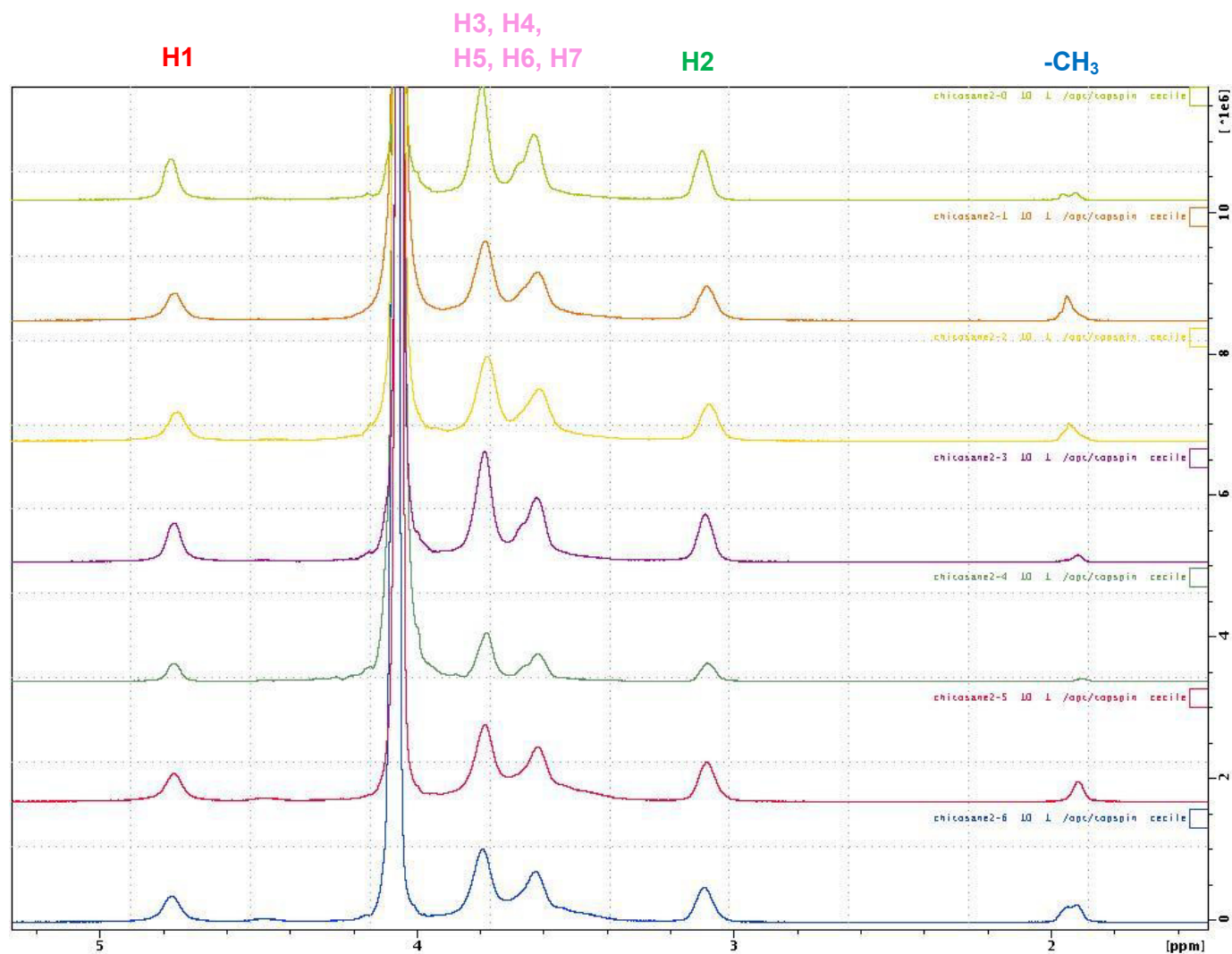


Figura 42. Espectros RMN- ^1H superpuestos en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ a 80°C de las muestras de Quitosano

Código del Quitosano
Q1-0
Q1-1
Q1-2
Q1-3
Q1-4
Q2
Q2-4

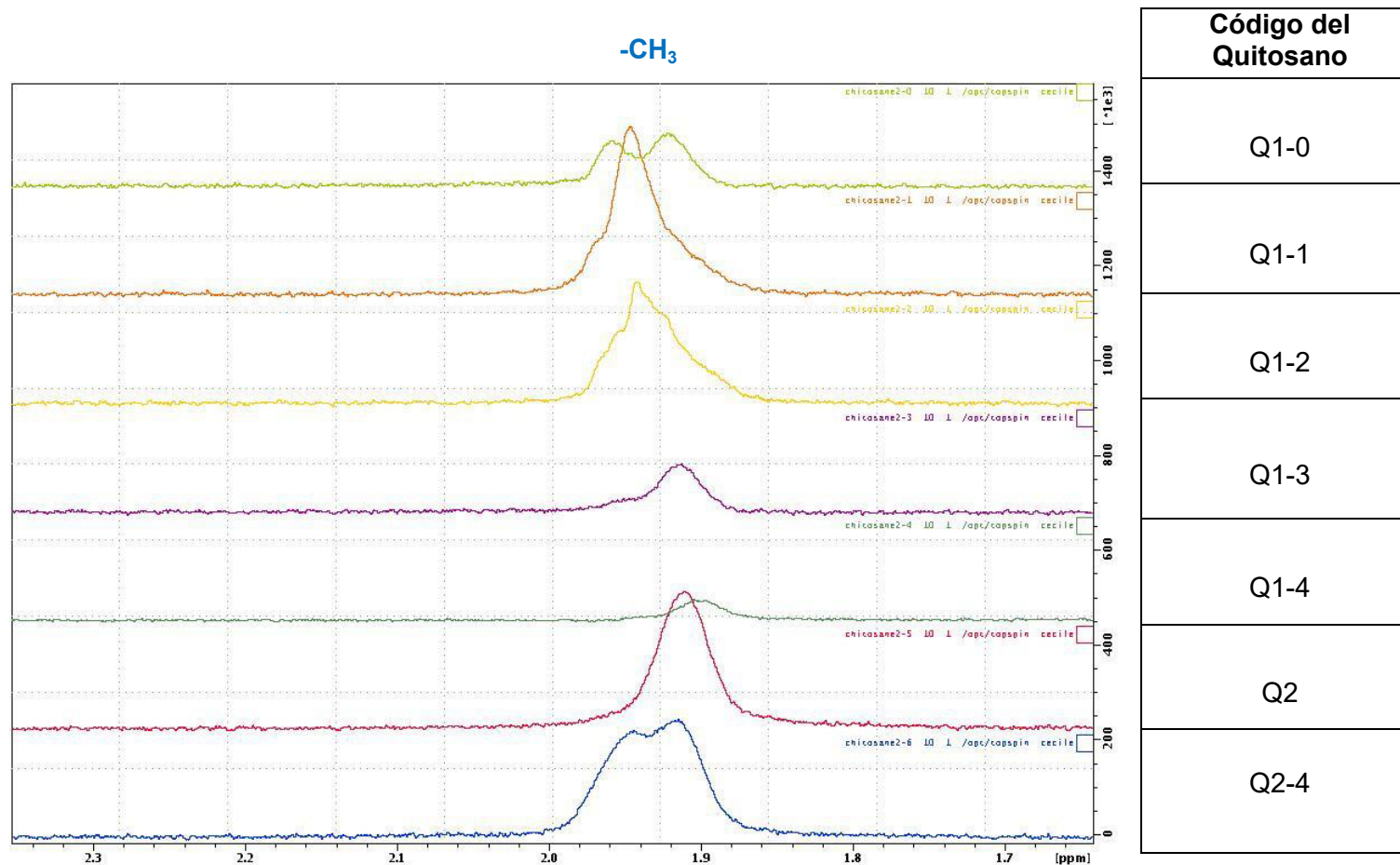
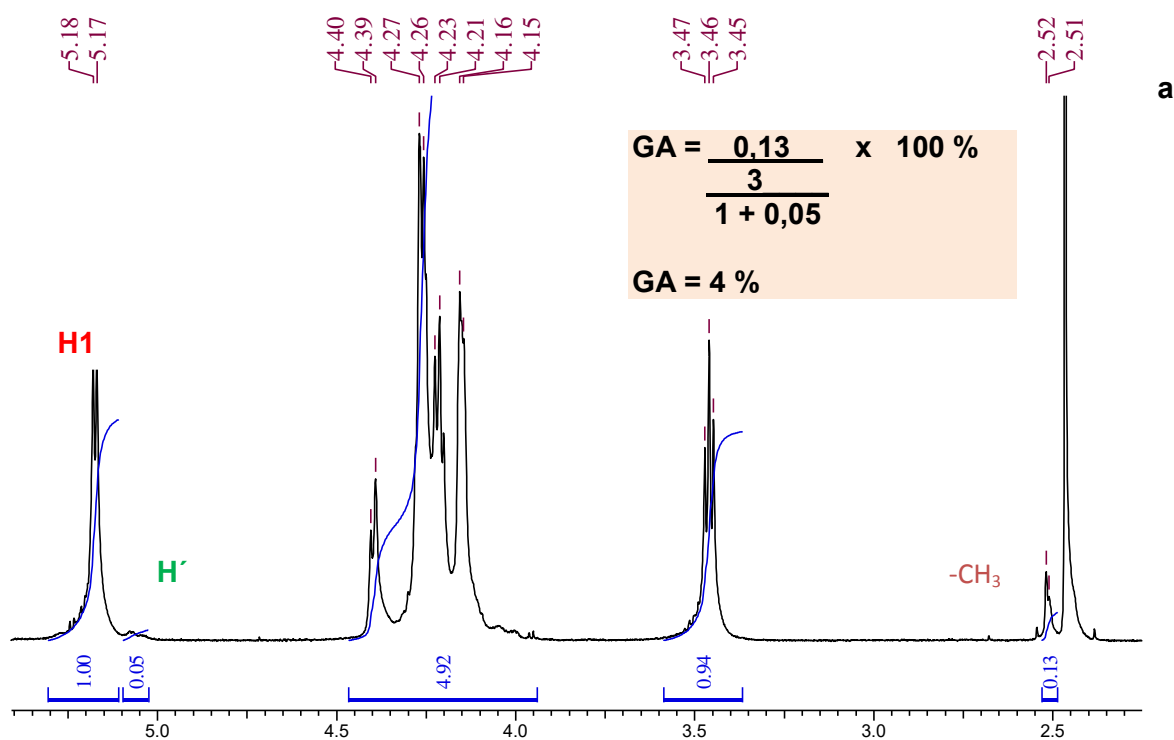


Figura 43. Ampliación de la señal del protón metilo del grupo acetilo en el espectro RMN-¹H en D₂O/DCl a 80 °C de las muestras de quitosano

Asimismo, los grados de acetilación con valores fuera de rango 16 y 12 % de Q1-1 y Q1-2, respectivamente, y el valor de 17 % de Q2-4, fueron reanalizados por RMN-¹H utilizando el buffer CD₃COONa / CD₃COOD a 80 °C. En la Figura 44 se observan los RMN-¹H de estas tres muestras de quitosano.

En cuanto al cálculo del grado de acetilación (GA), se realiza dividiendo entre 3 la integral de los protones metilo del grupo acetoamida (CH₃) y a este valor entre la integral de la suma de los protones H1 y H' de la unidad glucosamina y N-acetilglucosamina, respectivamente, debido al desdoblamiento de la señal CH₃ por causas mencionadas previamente, (ver cálculo en la Tabla 8).



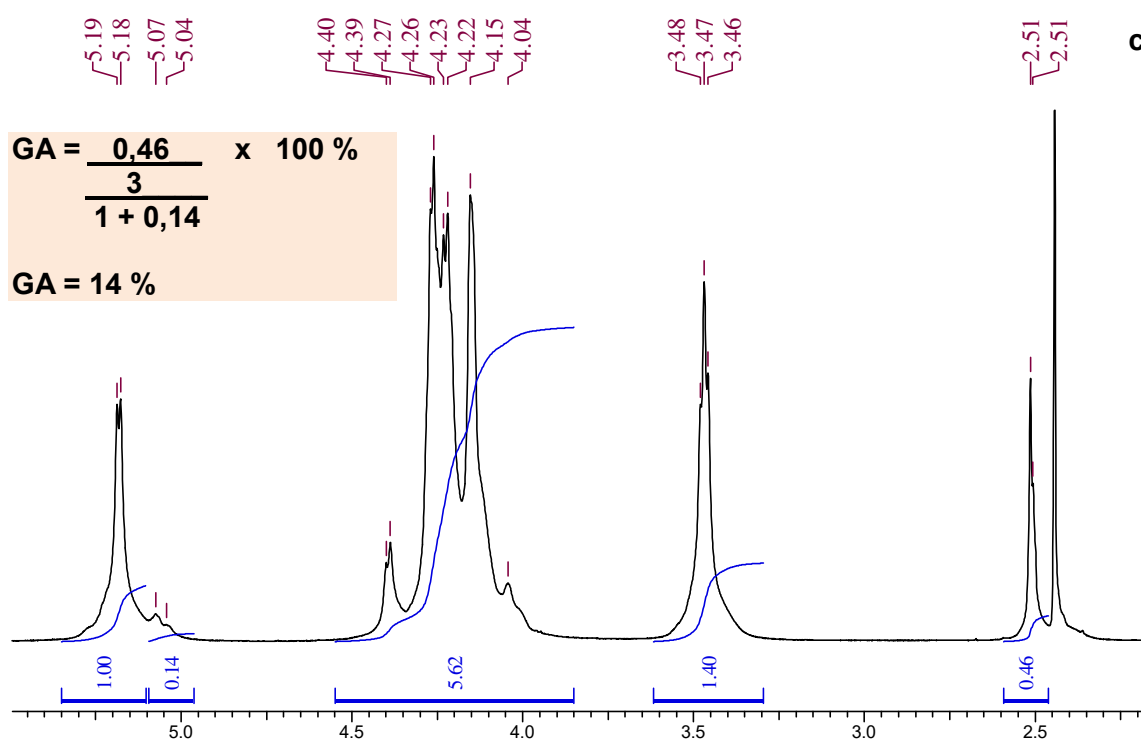
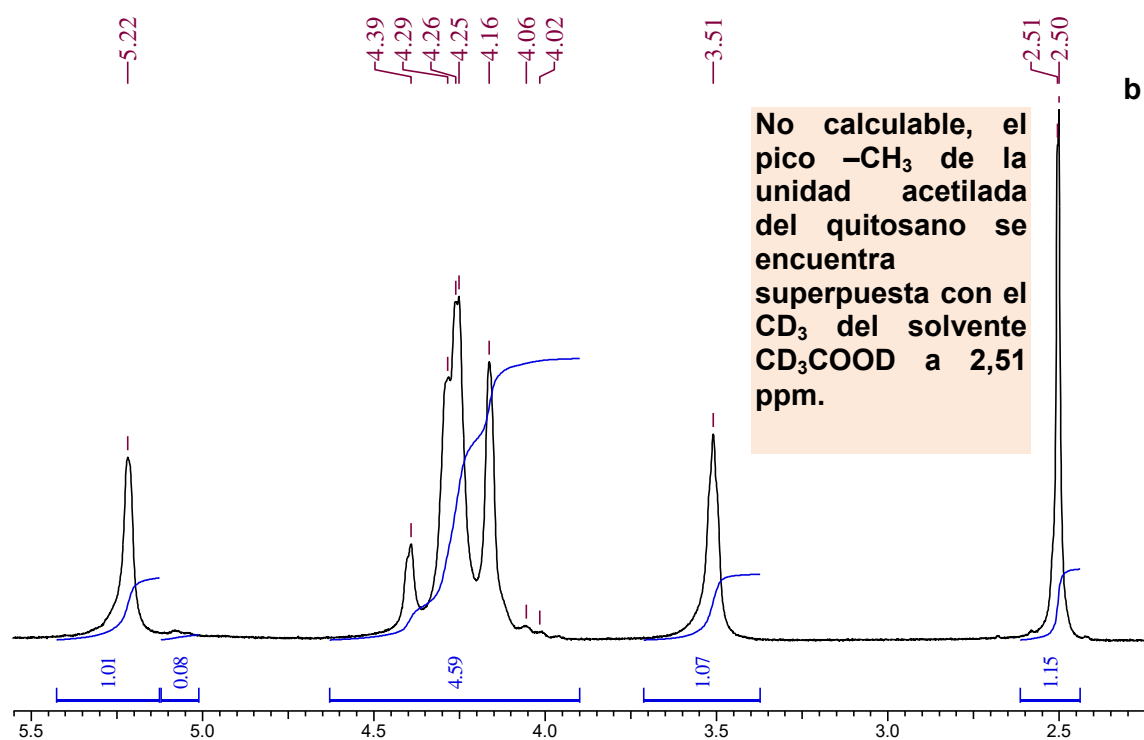


Figura 44. Espectros RMN- ^1H en el buffer $\text{CD}_3\text{COONa}/\text{CD}_3\text{COOD}$ a 80 °C de Q1-1 (a), Q1-2 (b) y de Q2-4 (c)

Tabla 8. Grado de acetilación de las muestras de quitosano analizados por RMN-¹H en el buffer CD₃COONa/CD₃COOD a 80 °C

Código de Quitosano	Temperatura de hidrólisis ácida con CH ₃ COOH 1 % v/v (°C)	Grado de acetilación
		$\frac{\text{Integral CH}_3}{\text{Integral (H1 + H')}} \times 100$ (GA) %
Q1-1	ambiente	4
Q1-2		No calculable
Q2-4	73 (al inicio) y temperatura ambiente (durante 4 semanas)	14

En la Tabla 8, se observa los resultados del GA de estas muestras de quitosano donde Q1-1 contiene un grado de acetilación de 4 % (Figura 44 - a), mientras que el grado de acetilación de Q1-2 es imposible de ser calculado por falta de resolución de los picos – CH₃ de la unidad acetilada del quitosano y del CD₃ del solvente CD₃COOD, los cuales se encuentran superpuestos a 2,51 ppm (Figura 44 - b). Por otro lado, en la Tabla 8 se observa que el grado de acetilación para Q2-4 es 14 % (Figura 44 - c). De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que el grado de acetilación de Q1 y sus derivados Q1-0 a Q1-4 se encuentra en el rango de 4 a 5 % y que el grado de acetilación de Q2 y Q2-4 es 14 %.

7.1.3.4. Peso molecular determinado por GPC

Los pesos moleculares de las muestras de quitosano fueron determinados por GPC y en la Figura 45 se muestran los cromatogramas GPC en función del índice de refracción (gráfica azul) y de la luz dispersada (gráfica roja).

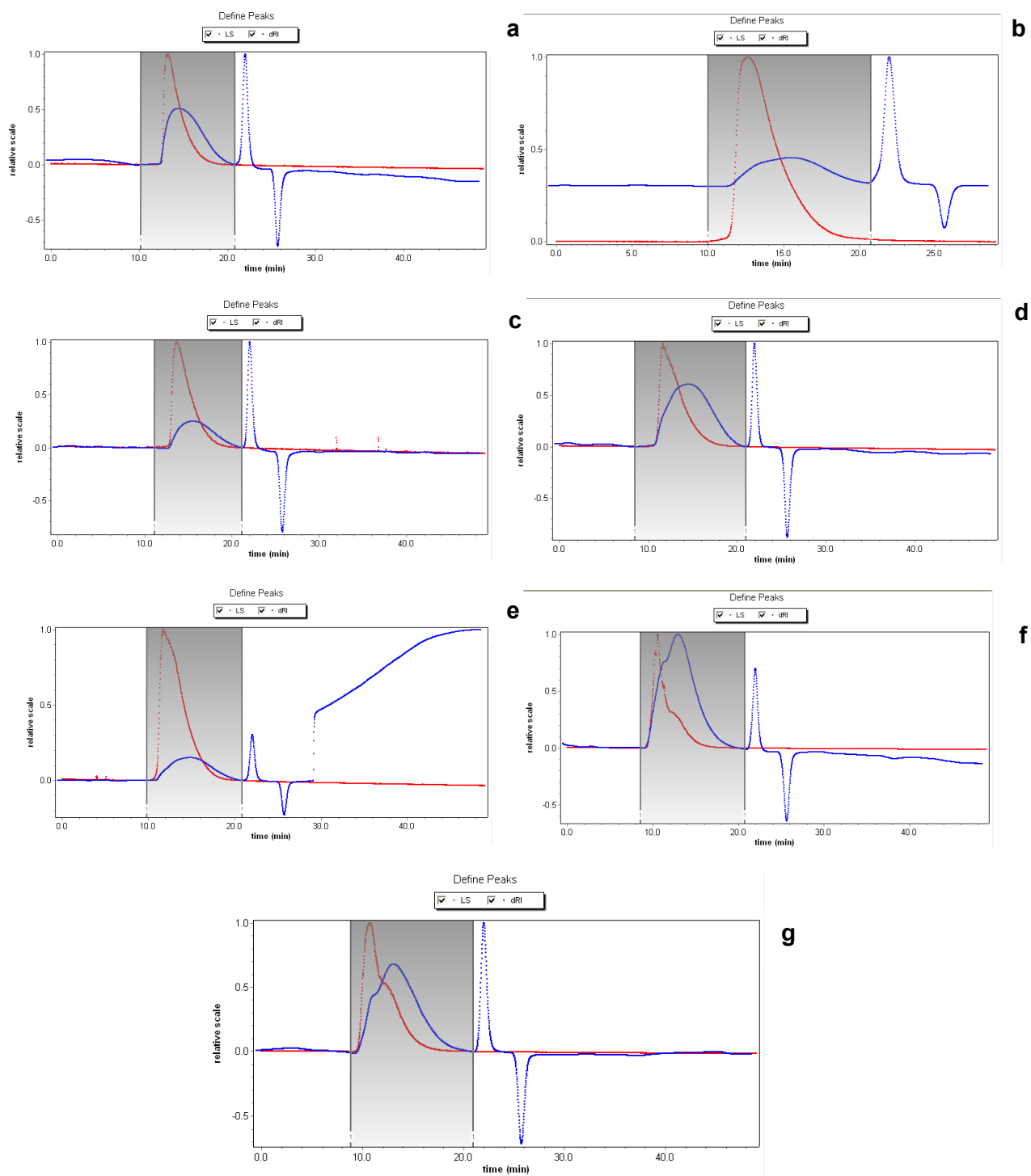


Figura 45. Cromatogramas GPC en función del índice de refracción (gráfica azul) y de la luz dispersada (gráfica roja) de los quitosanos obtenidos de la hidrólisis ácida con CH_3COOH 1 % v/v de Q1-0 (a), Q1-1 (b), Q1-2 (c), Q1-3 (d), Q1-4 (e), Q2 (f) y Q2-4 (g)

En la Figura 45, se observa que la línea roja es la gráfica con respecto a la dispersión de la luz, mientras que la línea azul es el gráfico en función del índice de refracción. La línea azul actúa como una línea base de manera que no se necesita una curva de calibración. La línea roja proporciona los valores que se utilizan para determinar el peso molecular. En esta gráfica específica, la línea roja está en una escala diferente de la línea azul, por lo que su pico no es discernible. Con el detector de índice de refracción, gráfica azul, se observan, a la derecha, picos por encima y debajo de la línea base, los cuales representan a los artefactos del instrumento después de que las muestras han pasado a través de la columna.

En la Tabla 9 se muestran los valores de los pesos moleculares promedio en peso (Mw), en número (Mn) y del índice de polidispersidad de las muestras de quitosano obtenidos de la hidrólisis ácida de Q1.

Tabla 9. Peso molecular determinado por GPC de las muestras de quitosano obtenidos de la hidrólisis ácida de Q1.

Código de Quitosano	Temperatura de hidrólisis ácida con CH ₃ COOH 1 % v/v (°C)	Peso Molecular (Mw) (Da)	Mn (Da)	Índice de Polidispersidad
Q1-0	73	$1,491 \times 10^5$	$5,852 \times 10^4$	2,547
Q1-1	ambiente	-	-	-
Q1-2		$1,284 \times 10^6$	$1,654 \times 10^5$	7,763
Q1-3		$5,722 \times 10^5$	$1,083 \times 10^5$	5,283
Q1-4		$3,524 \times 10^5$	$7,266 \times 10^4$	4,851

El peso molecular promedio en peso Mw es el que se tomará en cuenta para indicar el peso molecular del quitosano porque está dominado por las moléculas de mayor tamaño que aportan la mayor parte de la masa total de la muestra polimérica.³⁵

En la Tabla 9 se observa que el peso molecular de Q1-0 ($1,491 \times 10^5$ Da) es menor a Q1-2, Q1-3 y Q1-4, cuyos pesos moleculares son $1,284 \times 10^6$; $5,722 \times 10^5$ y

$3,524 \times 10^5$ Da, respectivamente, debido a que Q1-0 fue depolimerizada a una temperatura de 73 °C, mientras que las demás muestras fueron depolimerizadas a temperatura ambiente. Mediante este resultado se confirma que a mayor temperatura de hidrólisis ácida la depolimerización del quitosano es mayor. Por otro lado, el peso molecular de Q1-2, Q1-3 y Q1-4, depolimerizadas a la misma temperatura (temperatura ambiente), es mayor para Q1-2 y los valores descienden hacia Q1-4, como es de esperarse, porque esta última muestra estuvo expuesta más tiempo a la hidrólisis ácida.

Con respecto a Q1-1 fue difícil realizar una lectura exacta de su peso molecular por GPC debido a su baja solubilidad. Esta muestra a diferencia de los demás quitosanos fue disuelta dejándola toda una noche en una estufa y, luego, centrifugada para eliminar las partículas que aún persistían en solución. Este proceso de disolución por el cual la muestra estuvo expuesta a una temperatura alta y en un medio ácido influyó para obtener un bajo peso molecular (M_w) de esta fracción soluble, siendo este peso molecular de $2,053 \times 10^5$ Da, con un M_n de $6,334 \times 10^4$ Da y un índice de polidispersidad de 3,24, los cuales representan resultados no confiables.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 9, se decide hidrolizar a Q2 a 73 °C y dejarla en reposo por un tiempo de 4 semanas a temperatura ambiente para luego recuperarlo en medio básico con el objetivo de obtener un quitosano de bajo peso molecular (Q2-4) para que su solubilidad sea mayor y favorezca la fácil preparación de las soluciones coloidales.

En la Tabla 10 se observan los pesos moleculares de Q2 y Q2-4.

Tabla 10. Peso molecular determinado por GPC de las muestras de quitosano Q2 y Q2-4.

Código de Quitosano	Temperatura de hidrólisis ácida con CH ₃ COOH 1 % v/v (°C)	Peso Molecular (Mw) (Da)	Mn (Da)	Índice de Polidispersidad
Q2	-	2,278 x 10 ⁶	2,67 x 10 ⁵	8,530
Q2-4	73 (al inicio) y temperatura ambiente (durante 4 semanas)	8,935 x 10 ⁵	1,691 x 10 ⁵	5,285

Se observa que Q2 posee un peso molecular de 2,278 x 10⁶ Da y Q2-4 tiene un menor peso molecular (8,935 x 10⁵ Da) debido a que esta última muestra estuvo sometida a hidrólisis en un inicio a 73 °C y luego por un tiempo de 4 semanas a temperatura ambiente.

Por otro lado, de acuerdo a los índices de polidispersidad de todas las muestras de quitosano (Tablas 9 y 10) se observa que los quitosanos con mayor peso molecular poseen un mayor índice de polidispersidad, en este caso Q2 tiene un valor de 8,53.

7.1.3.5. Análisis SEM

En la Figura 46 se observa las imágenes SEM del quitosano (Q2-4) a dos diferentes magnificaciones de 80 y 250X.

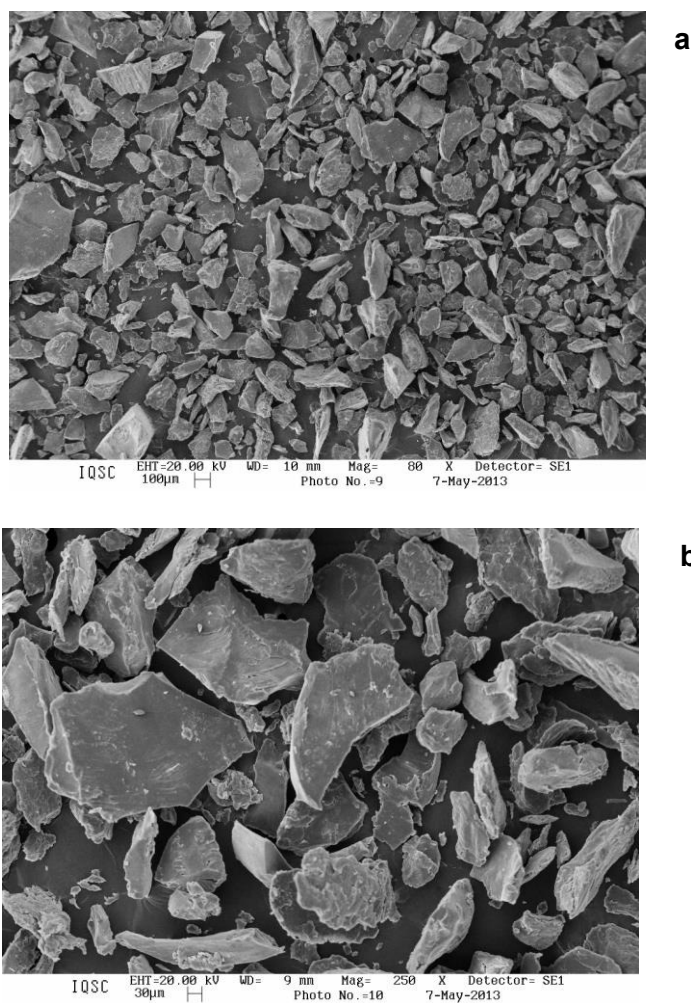


Figura 46. Imágenes SEM del quitosano (Q2-4) a dos magnificaciones: 80 (a) y 250X (b)

En la Figura 46 se observa, a dos diferentes magnificaciones de 80 y 250X, que el quitosano es una muestra muy homogénea de forma irregular, que contiene aglomerados en forma de granos, los cuales son muy similares entre si.

7.1.3.6. Análisis DRX

En la Figura 47 se observa el difractograma de rayos X del quitosano Q2-4.

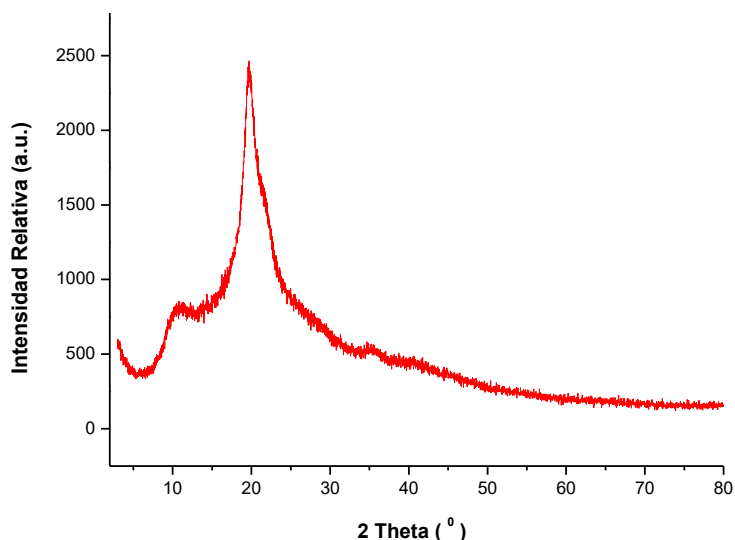


Figura 47. Difractograma de rayos X del quitosano (Q2-4)

Se observa que el quitosano presenta dos caídas de reflexión $2\theta = 11$ y 20° . La banda a 11° se asigna a la forma cristalina I, mientras que el pico de mayor intensidad que aparece a 20° corresponde a la forma cristalina II característico de la estructura β del quitosano de pota, confirmándose con lo que se encuentra reportado en la literatura.^{64,117}

7.2. Polisuccinimida

7.2.1. Síntesis

La polisuccinimida se obtuvo de la catálisis ácida con ácido fosfórico del monómero ácido aspártico.^{43,94,95} El mecanismo de reacción de síntesis es presentado en la Figura 48 de acuerdo a lo reportado en la literatura.³⁶

En la Figura 48 se observa que el H_3PO_4 se desprotona por el ataque del grupo oxidrilo (HO) del monómero ácido aspártico. Luego, el monómero protonado (a) es atacado por el grupo amina de otro ácido aspártico para formar la especie intermediaria (b), la cual sufre de desprotonación por la especie H_2PO_4^- para formar el dímero (c), el cual continúa reaccionando con el H_3PO_4 y el monómero hasta la formación del polímero (d). Este, a su vez, sufre de una reacción intramolecular por ataque del nitrógeno amida al carbono carbonilo del grupo ácido carboxílico, formándose, finalmente, la polisuccinimida (e) con liberación de moléculas de agua.³⁶

DL-ácido aspártico

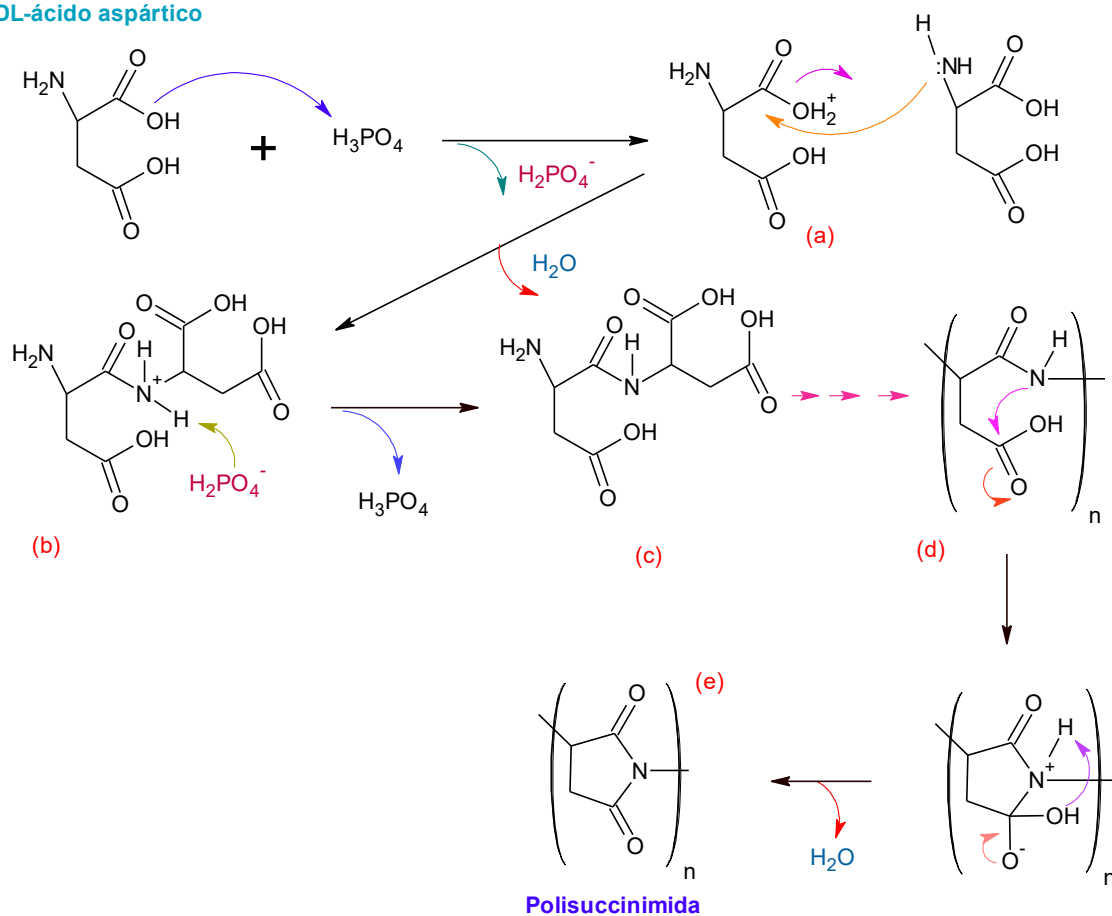


Figura 48. Mecanismo de reacción de la síntesis de la polisuccinimida.³⁶

7.2.2. Caracterización

7.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja

El espectro IR de la polisuccinimida nos confirma que efectivamente se ha obtenido el producto objetivo de acuerdo a lo reportado en la literatura.^{36,118-123}

En la Figura 49 se presenta el espectro IR (ATR) de la polisuccinimida. Se observa que la banda ancha a 3598 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento O-H del H_2O , mientras que los picos de baja intensidad a 3002 y 2946 cm^{-1} le pertenecen a los estiramientos asimétrico y simétrico C-H del CH_2 del anillo imida, respectivamente.

Por otro lado, las señales 1795 y 1703 cm^{-1} se asignan a los estiramientos simétrico y asimétrico del C=O del anillo imida, respectivamente. La presencia del pico a 1625 cm^{-1} de muy baja intensidad corresponde a la flexión O-H del H_2O . Además, los dos picos de alta intensidad a 1387 y 1356 cm^{-1} le pertenecen al tijereteo simétrico y asimétrico del C-H del grupo CH_2 del anillo imida, respectivamente. Por otro lado, los dos picos 1287 y 1255 cm^{-1} de baja intensidad se asignan a la vibración de estiramiento asimétrico y simétrico C-N-C del anillo imida, respectivamente, mientras que los picos de alta intensidad a 1209 - 1159 cm^{-1} corresponden a la flexión C-H en el plano del grupo CH_2 . El pico a 700 cm^{-1} se asigna a la flexión asimétrica (C=O)-N fuera del plano del anillo imida.

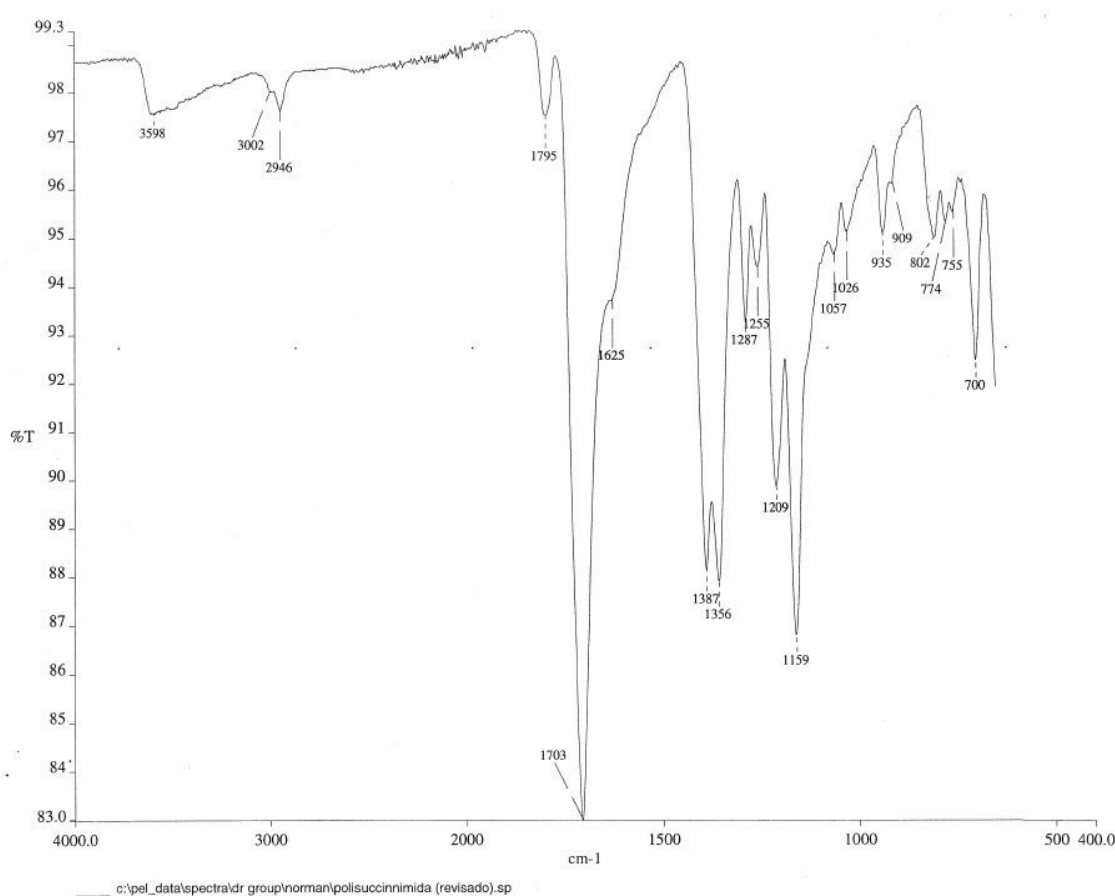


Figura 49. Espectro IR (ATR) de la polisuccinimida

7.2.2.2. Resonancia Magnética Nuclear

A través de la caracterización por RMN^{-1}H se confirma que se ha obtenido la polisuccinimida de alto grado de pureza de acuerdo a lo reportado en la literatura.^{36,124}

En la Figura 50 se observa el espectro RMN- ^1H de la polisuccinimida en $\text{DMSO}-d_6$. La señal singulete del protón metino resuena a 5,27 ppm, mientras que los protones metileno aparecen a 3,21 y 2,70 ppm. Se observa que estas dos últimas señales se encuentran superpuestas de manera parcial con el pico del agua el cual aparece a 3,42 ppm y con el pico del protón residual del DMSO a 2,5 ppm.

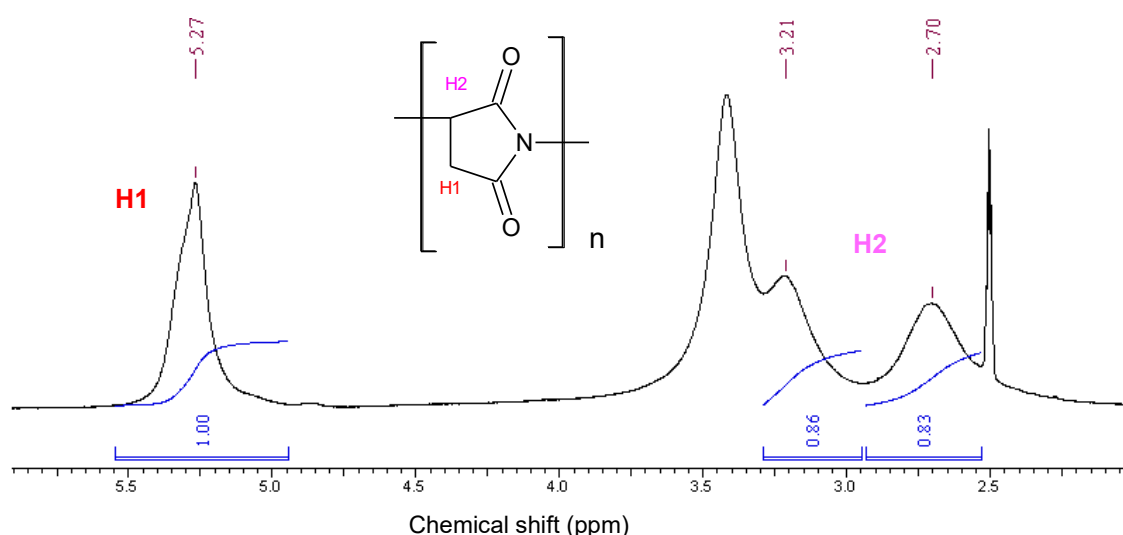


Figura 50. Espectro RMN- ^1H en $\text{DMSO}-d_6$ de la polisuccinimida

7.2.2.3. Determinación del peso molecular por viscosimetría capilar

El peso molecular determinado por viscosimetría capilar (M_v) se haya calculando, primero, la viscosidad reducida, η_{red} , de cada estándar de polisuccinimida a partir de los tiempos de flujo del solvente y del polímero t_o y t , respectivamente, y con la concentración de cada solución estándar, c ,³⁵ empleando la siguiente ecuación:

$$\eta_{red} = \frac{t - t_o}{c \cdot t_o}$$

En la siguiente Tabla 11 se observan los valores de viscosidad reducida determinada para cada concentración de la polisuccinimida.

Tabla 11. Datos de la gráfica de la viscosidad reducida versus concentración de polisuccinimida

Concentración de la polisuccinimida (g/mL)	Viscosidad reducida de la polisuccinimida (mL/g)
0,008	29,69
0,006	30,06
0,004	30,88
0,002	31,15

A partir de las viscosidades reducidas y concentraciones de cada solución de polisuccinimida se construye la gráfica correspondiente (Figura 51).

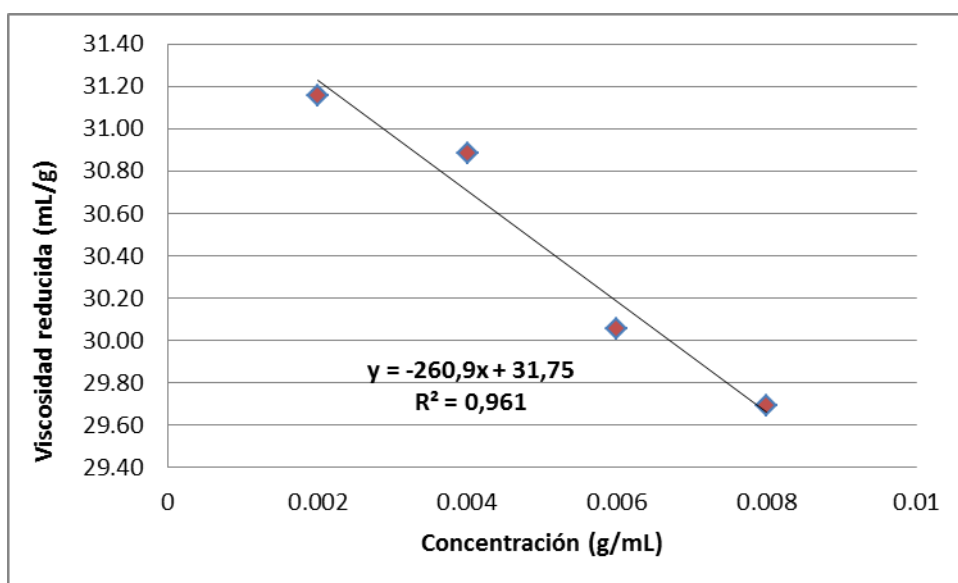


Figura 51. Gráfica de la viscosidad reducida versus la concentración de la polisuccinimida

De la ecuación de la gráfica se calcula la viscosidad intrínseca, $[\eta]$, extrapolando la concentración a cero. Entonces, $[\eta]$ es igual a 31,75 mL/g. A partir de este valor se calcula el peso molecular promedio de viscosidad, M_v , reemplazándolo en la ecuación

logarítmica de Mark-Houwink (1). Los valores de K y a , a 25 °C, son 0,0132 mL/g y 0,76, respectivamente.^{43,125}

$$[\eta] = K \cdot M_v^a$$

$$M_v = \text{Antilog} \left[\frac{\log[\eta] - \log K}{a} \right] \dots\dots\dots (1)$$

Por lo tanto, el peso molecular promedio de la polisuccinimida es de 18,20 kDa

7.3. Poliacido aspártico

7.3.1. Síntesis

El poliacido aspártico se obtiene de la hidrólisis básica de la polisuccinimida, la cual se realiza a pH 11,5 a 12 lo cual significa que en un inicio se tenía grupos carboxilatos los cuales fueron protonados con ácido clorhídrico a pH 3, asegurando que el polímero se encuentre completamente protonado dado que el pKa de esta macromolécula es 4,78¹²⁶, en esta forma ácida, el polímero precipita fácilmente en metanol, mientras que en la forma de sal es imposible la precipitación por la alta solubilidad del poliaspartato. En la siguiente Figura 52 se observa el mecanismo de reacción de la síntesis del poliacido aspártico adaptado de la literatura.³⁶

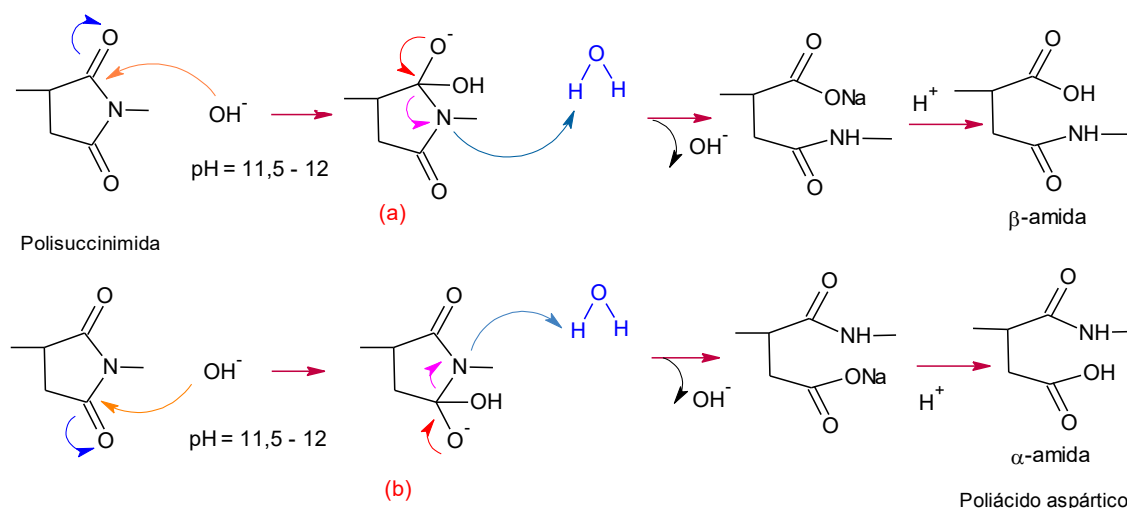


Figura 52. Mecanismo de reacción de la síntesis del poliacido aspártico. *Adaptado de la referencia 36*

En la Figura 52 se observa que los iones OH^- atacan al grupo carbonilo del anillo imida para formar (a) o (b), los cuales sufren de hidrólisis para formar el poliaspartato, con la liberación de iones OH^- . Según el ataque de los iones OH^- a los carbonos carbonilo no equivalentes del anillo imida se formarán las unidades α -amida ó β -amida.³⁶ Finalmente, para obtener el políácido aspártico se protonan los grupos carboxilatos con HCl 20 %.

7.3.2. Caracterización

Espectroscopia Infrarroja

El espectro IR del políácido aspártico nos confirma que se ha obtenido el producto de interés de acuerdo a lo reportado en la literatura.³⁶

En la Figura 53 se observa el espectro IR (ATR) del políácido aspártico. El pico a 3284 cm^{-1} corresponde a los estiramientos N-H del grupo amida y O-H del grupo COOH, mientras que los picos 3080 y 2943 cm^{-1} se asignan a los estiramientos asimétrico y simétrico C-H del grupo CH_2 . Por otro lado, el pico 1716 cm^{-1} se asigna al estiramiento C=O del grupo COOH. El pico $1648 - 1589\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento C=O de la amida I. Además, el pico 1521 cm^{-1} corresponde a la flexión N-H en el plano de la amida II (superpuesta con el estiramiento C-N de la amida III).

La absorción a 1394 cm^{-1} pertenece a la flexión O-H en el plano del grupo COOH. El pico característico del grupo carboxílico aparece a $1229 - 1180\text{ cm}^{-1}$ el cual corresponde al estiramiento C-O del COOH. Por otro lado, los picos 1121 ; $1053 - 995$ y 907 cm^{-1} se asignan al estiramiento C-N, al estiramiento C-C y a la flexión O-H fuera del plano del grupo COOH.

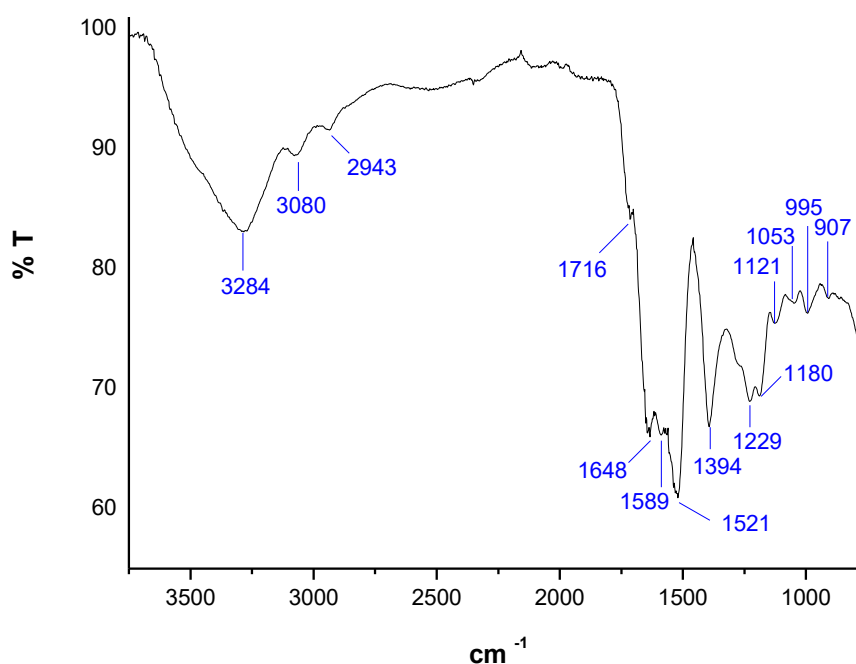


Figura 53. Espectro IR (ATR) del poliacido aspártico

7.4. Poliaspartato de sodio

7.4.1. Síntesis

El poliaspartato de sodio se obtuvo de la desprotonación, en medio básico con NaOH, de los grupos carboxílicos del poliacido aspártico.

7.4.2. Caracterización

7.4.2.1. Espectroscopia Infrarroja

De acuerdo al IR (ATR) mostrado en la Figura 54, se ha logrado obtener el poliaspartato de sodio de acuerdo a lo reportado en la literatura.^{36,127-131}

La banda de absorción a 3259 cm⁻¹ se asigna al estiramiento N-H del grupo amida, y los picos 3070 y 2924 cm⁻¹ corresponden a los estiramientos asimétrico y simétrico C-H del grupo CH₂, respectivamente. El pico 1580 cm⁻¹ se asigna al estiramiento C=O de la amida I superpuesto con el estiramiento asimétrico C=O del COO⁻, mientras que el pico 1524 cm⁻¹ pertenece a la flexión N-H en el plano de la amida II superpuesto con

el estiramiento C-N de la amida III. Por otro lado, las absorciones a 1393 y 1314 cm^{-1} corresponde al estiramiento simétrico del C=O del grupo COO^- .

Los picos 1281, 1244, 1191 y 1118 cm^{-1} se asignan a la torsión C-H del CH_2 , al estiramiento C-O del COO^- , a la flexión C-H en el plano y al estiramiento C-N, respectivamente, mientras que los picos 995 – 937 cm^{-1} al estiramiento C-C. Por último, la absorción 872 cm^{-1} pertenece al balanceo C-H fuera del plano del CH_2 .

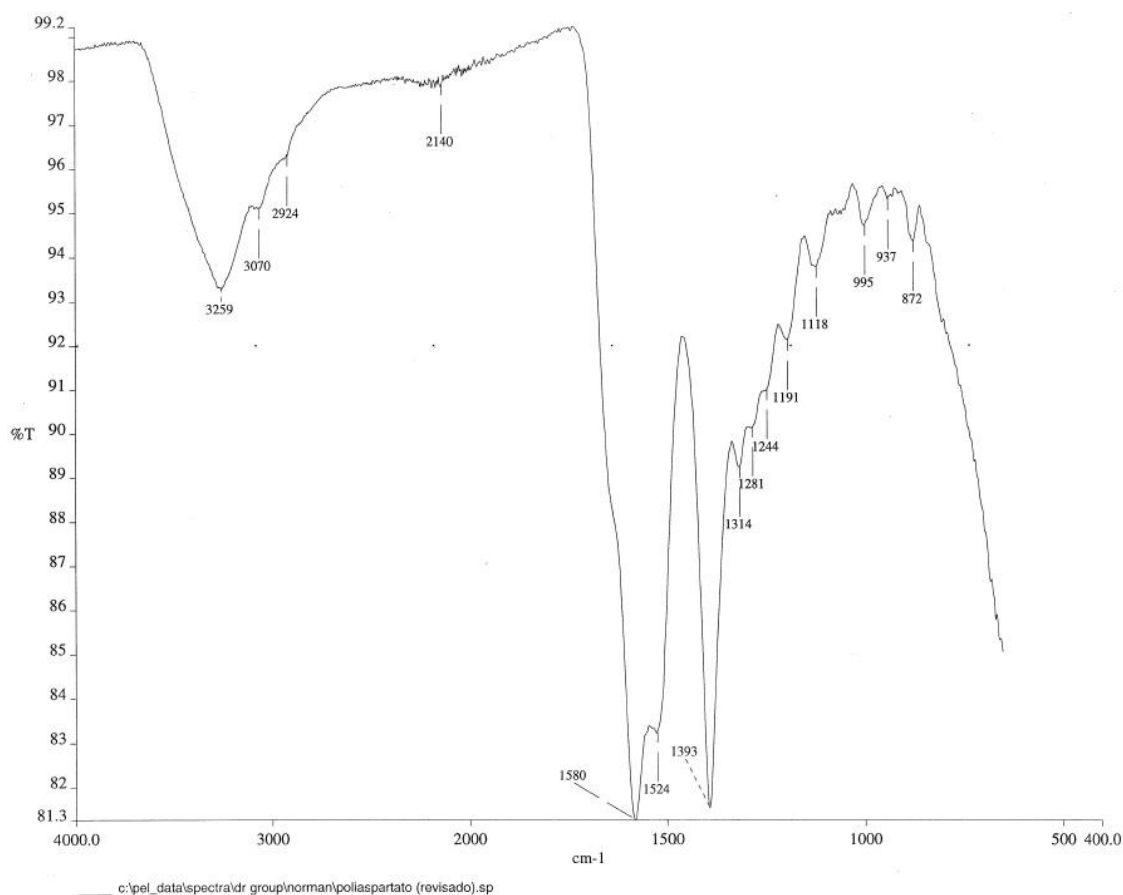


Figura 54. Espectro IR (ATR) del poliaspartato

7.4.2.2. Resonancia Magnética Nuclear

De acuerdo a los espectros $\text{RMN-}^1\text{H}$ y $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ se observa que se ha obtenido el poliaspartato con alto grado de pureza.^{36,124,132,133}

En la Figura 55 se muestra el espectro $\text{RMN-}^1\text{H}$ del poliaspartato, se observa a 4,62 ppm y 4,39 - 4,43 ppm la señal del protón metino, mientras que la señal del metileno resuena como un multiplete a 2,64 – 2,71 ppm.

De acuerdo a la literatura, la señal de mayor intensidad 4,39 - 4,43 ppm se asigna al protón metino de la unidad β , mientras que la señal menos intensa a 4,62 ppm corresponde al protón metino de la unidad α .^{124,132,133} Por otro lado, el % de unidades α y β es posible calcularlo a partir de las integrales de los protones metino. Por lo tanto, el % de unidades β y α es 86,1 y 13,9 %, respectivamente (Figura 56).

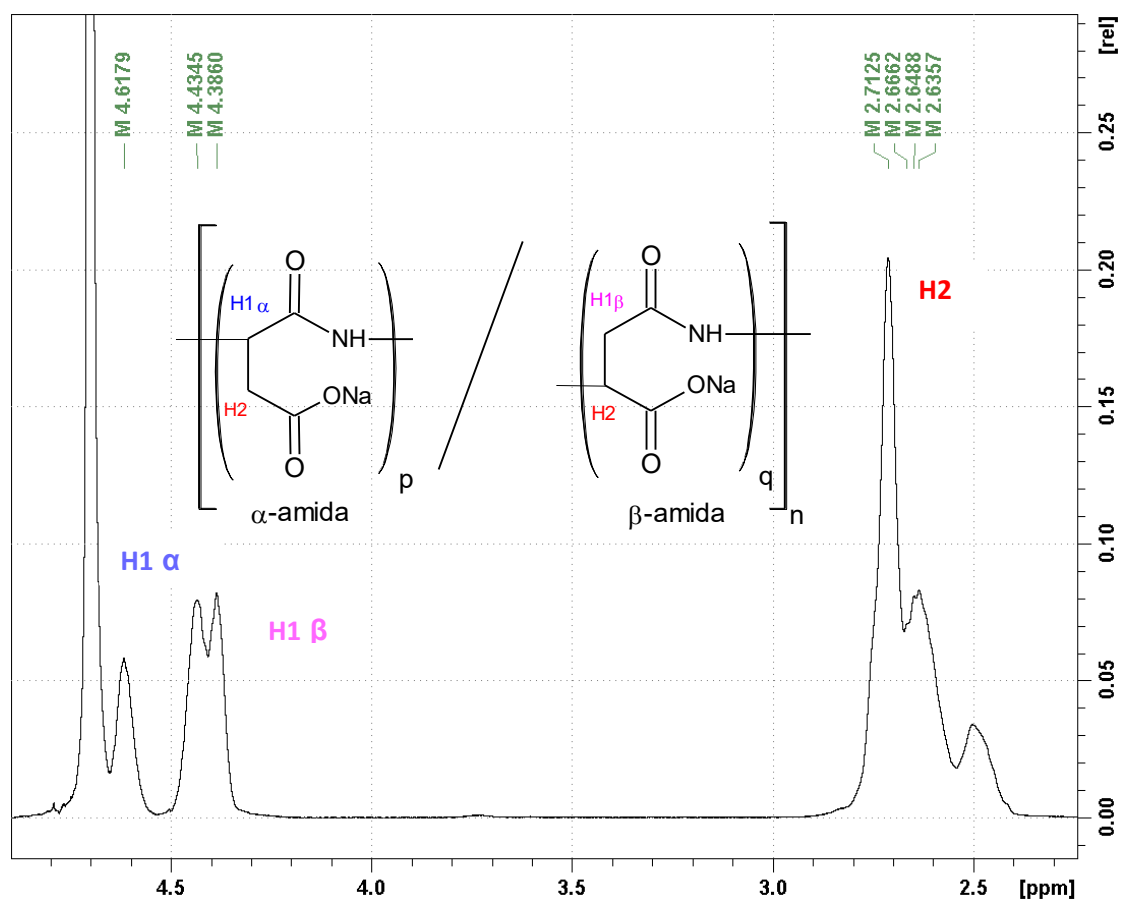


Figura 55. Espectro RMN- ^1H en D_2O del Poliaspartato

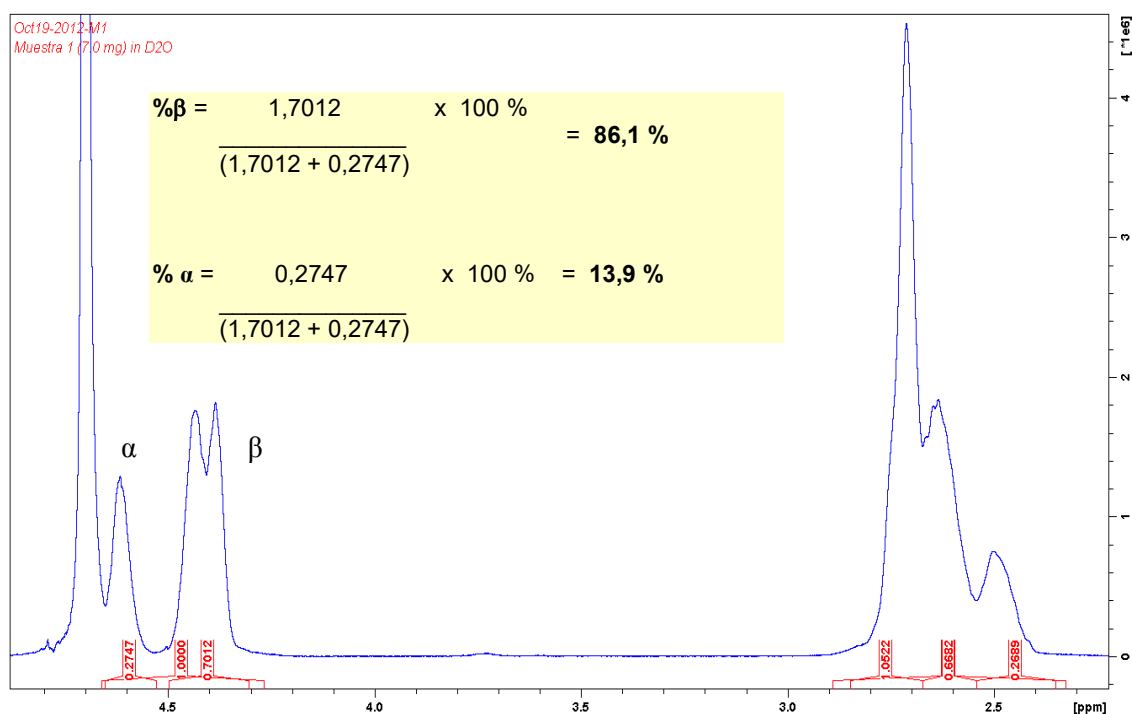


Figura 56. % de unidades β y α del poliaspartato determinado por RMN- ^1H en D_2O

Por otro lado, en la Figura 57 se presenta el espectro RMN- ^{13}C del poliaspartato en tres escalas de 0 a 200 ppm (a); 35 a 55 ppm (b) y 170 a 180 ppm (c). Se observa que el carbono metileno (**C3**) resuena como dos picos entre 37 a 40 ppm. La resonancia del carbono metino (**C2**) aparece como un multiplete entre 51 - 53 ppm. Los picos entre 171,7 a 174 ppm corresponden al carbono del grupo carbonilo de la amida (**C1**). Finalmente, entre 173,4 a 178 ppm aparece el carbono del grupo carboxilato (**C4**).

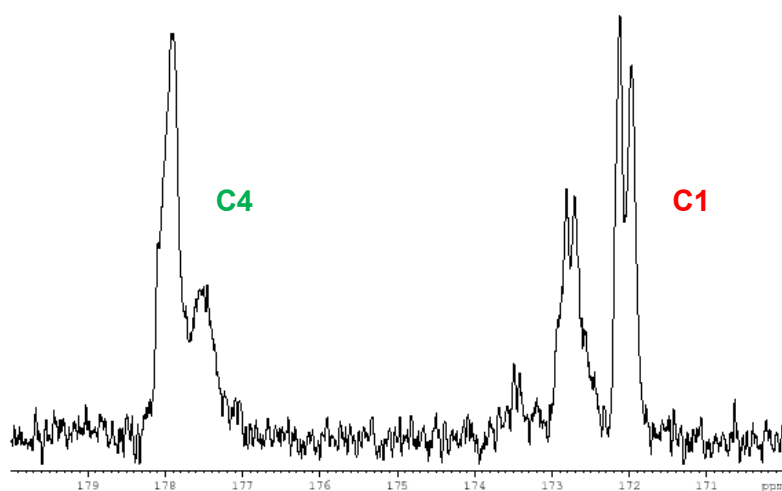
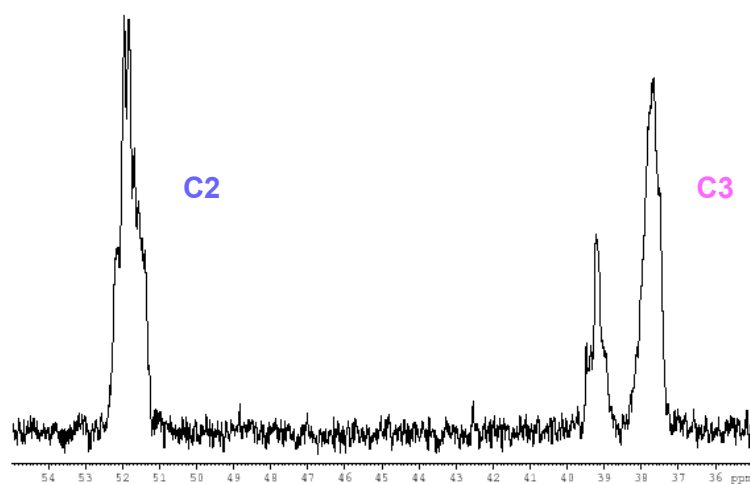
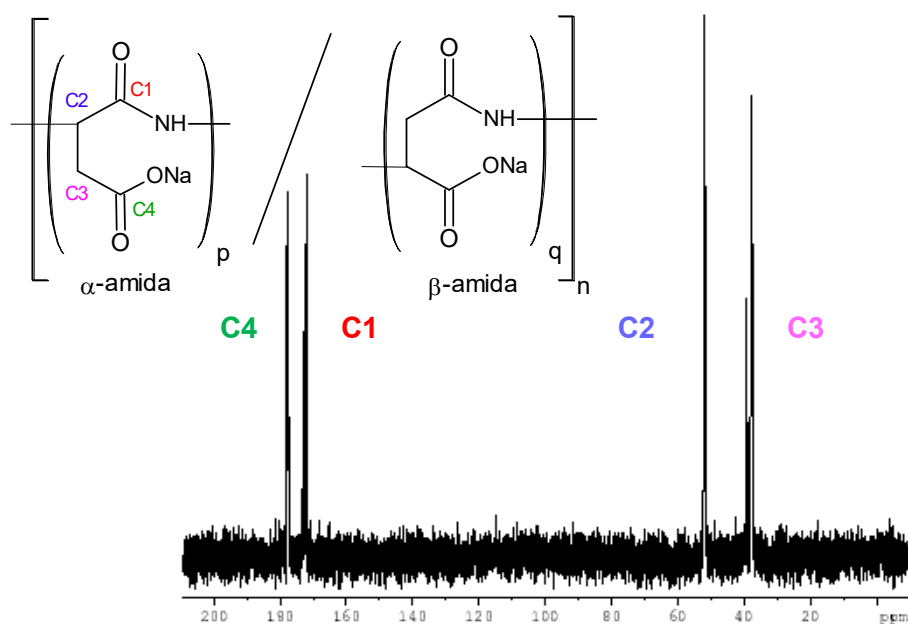


Figura 57. Espectro RMN- ^{13}C en D_2O del poliaspartato: escala 0 a 200 ppm (a), escala 35 a 55 ppm (b) y escala 170 a 180 ppm (c)

7.4.2.3. Determinación del peso molecular por SLS

En la Figura 58 se observa la gráfica Debye Plot construido con diferentes concentraciones de poliaspartato.

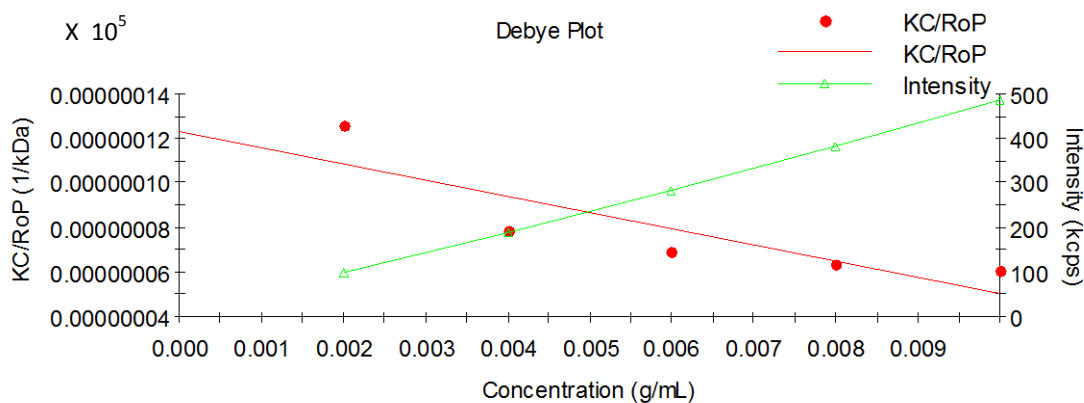


Figura 58. Gráfica Debye Plot de Concentración versus Intensidad y KC/RoP

En la Figura 58 se observa el intercepto de la gráfica color rojo en la ordenada KC/RoP, cuyo valor es 0,1233 1/kDa siendo el peso molecular del poliaspartato la inversa de este valor es decir 8,11 kDa. Este valor es debido a que el poliaspartato se obtuvo de la hidrólisis básica de la polisuccinimida cuyo peso molecular es 18,2 kDa, el cual disminuye a 8,11 kDa (aprox. 45 % de disminución) debido al pH muy básico (12,5) y al tiempo de hidrólisis al cual fue sometido.

7.4.2.4. Análisis SEM

En la Figura 59 se muestra las imágenes SEM del poliaspartato a tres magnificaciones 200, 500 y 1000X. Se observa que el poliaspartato posee una morfología homogénea irregular con superficie lisa y porosa.

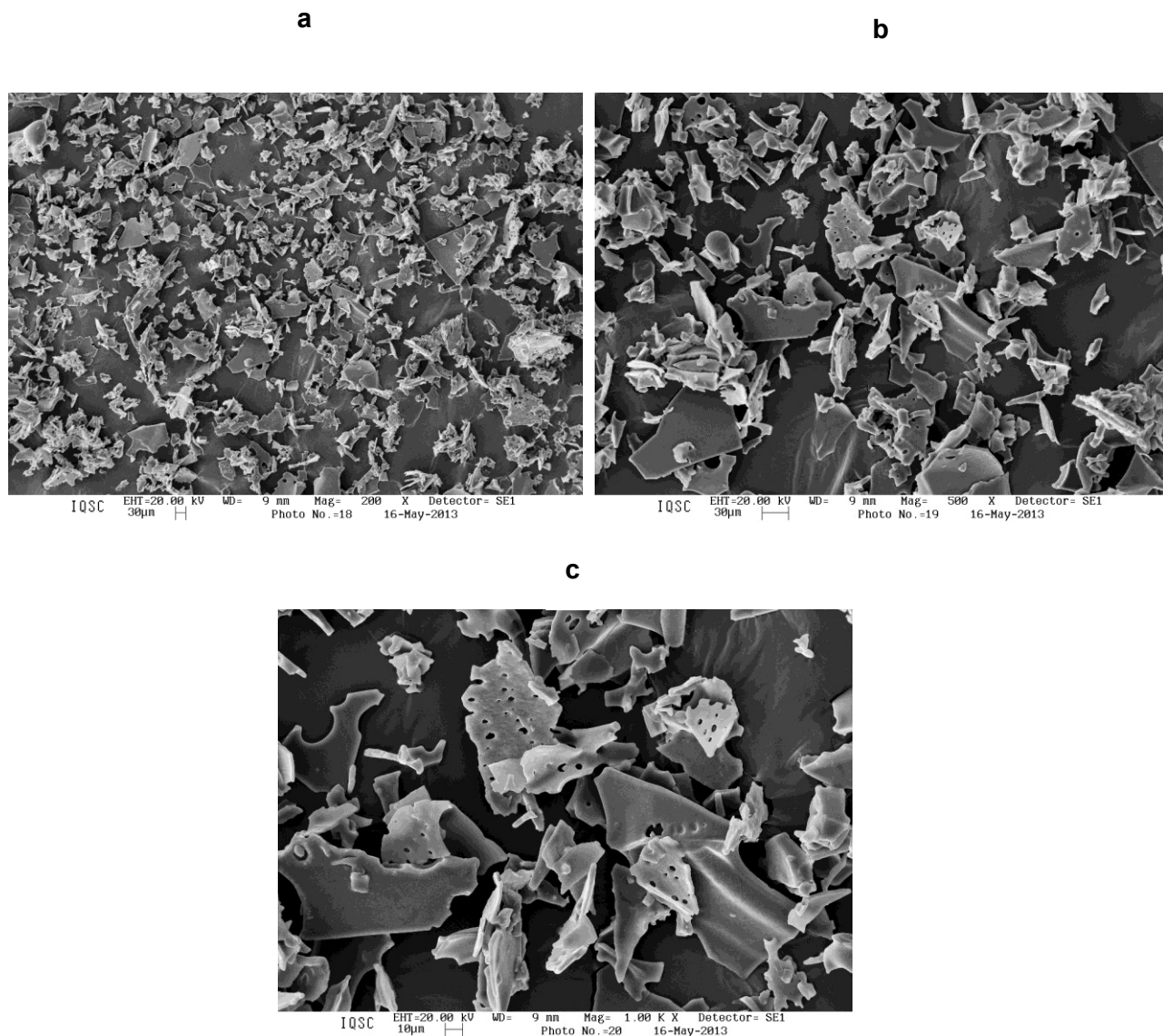


Figura 59. Imágenes SEM del poliaspartato a diferentes magnificaciones: 200 (a), 500 (b) y 1000X (c)

7.4.2.5. Análisis DRX

En la Figura 60 se observa el difractograma de rayos X del poliaspartato. Se observa que las bandas características del poliaspartato son una muy ancha y de alta intensidad a 28° , y una pequeña y de baja intensidad a 12° . El difractograma de rayos X experimental corresponde al poliaspartato evidenciando su naturaleza amorfa orgánica de baja cristalinidad.

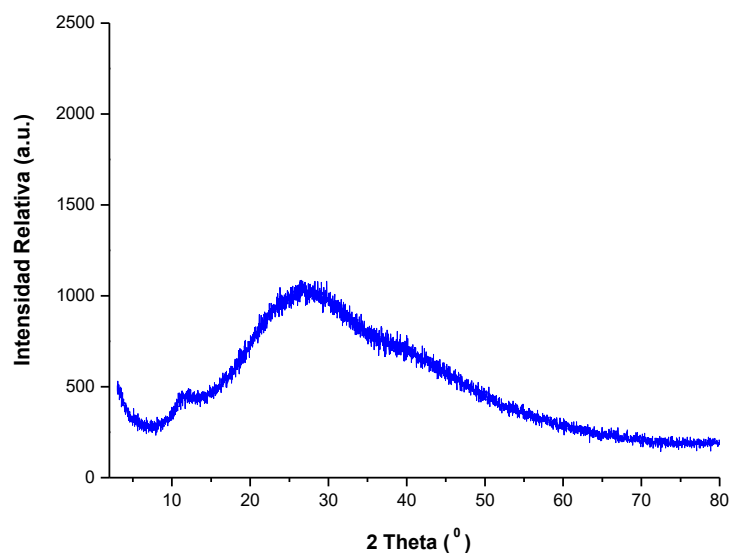


Figura 60. Difractograma de rayos X del poliaspartato

7.5. Complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico

7.5.1. Solución coloidal

7.5.1.1. Síntesis

Las soluciones coloidales de quitosano-poliácido aspártico (Q-PAA) fueron preparadas como se describe en la Tabla 1, con las diferentes muestras de quitosano y con el mismo polímero de poliaspartato. Estas soluciones se caracterizan por ser soluciones turbias y estables porque no presentan precipitado. Asimismo, en la Figura 61 se observa la dispersión de la luz láser a través de la solución coloidal (Efecto Tyndall).

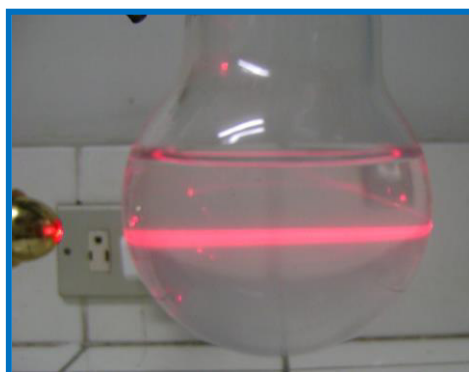


Figura 61. Efecto Tyndall de la solución coloidal Q-PAA

Las soluciones coloidales se preparan con las soluciones de quitosano y poliaspartato de pH 4 y 7, respectivamente, porque a estos pH el quitosano se encuentra en la forma protonada en los grupos amino y el poliaspartato se encuentra cargado negativamente en los grupos carboxílicos desprotonados debido a que el quitosano y el poliaspartato poseen un pKa de 6,3 y 4,87, respectivamente.^{134,135} Por lo tanto, ambos polímeros cargados positiva y negativamente se unen por atracción electrostática.

Por otro lado, las soluciones coloidales se preparan al agregar el poliaspartato sobre la solución de quitosano con el objetivo de obtener partículas más pequeñas de acuerdo a lo reportado en la literatura referente a nanopartículas de complejos interpoliméricos de quitosano y poliácido glutámico, siendo este último polímero estructuralmente similar al poliácido aspártico, cuya diferencia es que el poliácido glutámico contiene un grupo CH₂ más que el poliácido aspártico (Figura 62).²⁹ En el siguiente acápite, por análisis DLS, se llega a demostrar que efectivamente al agregar el poliaspartato sobre el quitosano se obtienen partículas más pequeñas que al añadir los reactivos en el orden inverso.

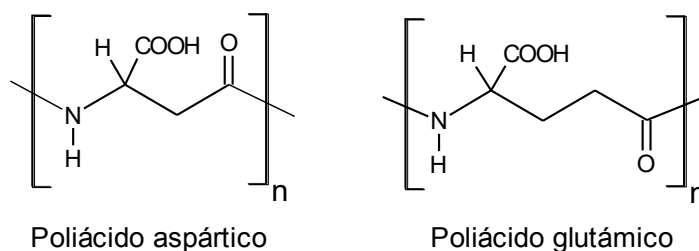


Figura 62. Estructuras del poliácido aspártico y del poliácido glutámico

7.5.1.2. Caracterización

Las soluciones coloidales de Q-PAA, preparadas de acuerdo a la Tabla 1, fueron centrifugadas a 4 °C siendo los sobrenadantes analizados por DLS, AFM y TEM. Se debe mencionar que la cantidad de pellet formado fue aproximadamente 1 mg para los once análisis de la Tabla 1.

Análisis DLS

Las soluciones coloidales sobrenadante diluidas (Tabla 2) se analizaron por DLS. En la Figura 63 se observa la distribución del tamaño de las partículas de la solución

coloidal sobrenadante diluida de Q-PAA1. La distribución del tamaño de las partículas de las demás soluciones coloidales sobrenadante diluidas de Q-PAA2-11 se encuentran en el Anexo 1.

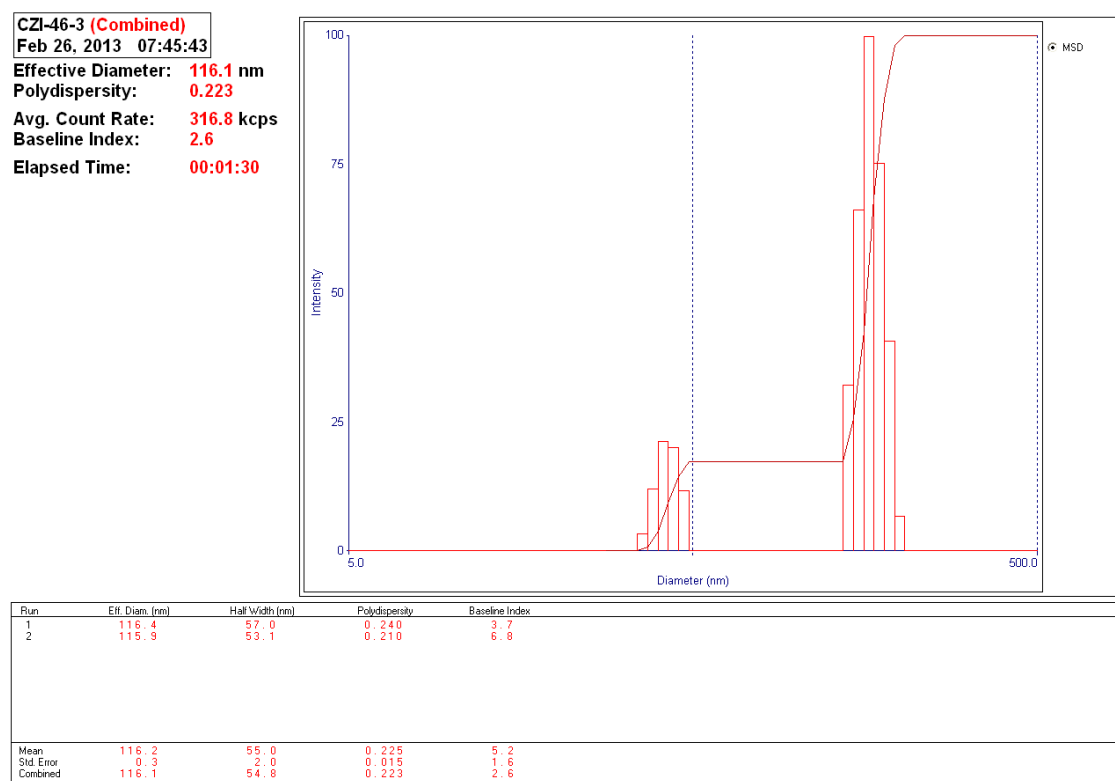


Figura 63. Distribución del tamaño de las partículas de la solución coloidal sobrenadante diluida de Q-PAA1, analizado por DLS

Los resultados del diámetro efectivo promedio de las partículas de cada una de las soluciones coloidales sobrenadante diluidas de Q-PAA1-11 son presentados en la Tabla 12.

Tabla 12. Diámetro efectivo promedio de las partículas de las soluciones coloidales sobrenadante diluidas de Q-PAA1-11 analizados por DLS

Código de la solución coloidal sobrenadante	Relación en peso W Quitosano/ W poliaspartato (mg/mg)	QUITOSANO			Análisis por DLS	
		Código	Grado de acetilación (%)	Peso mole- cular (kDa)	Diámetro efectivo promedio (nm)	Polidispersidad
Q-PAA1	2,87 : 1	Q1-0	5	149,1	116,1 ± 0,3	0,223 ± 0,015
Q-PAA2	7,17 : 1	Q1-1	4	-	145,1 ± 4,5	0,253 ± 0,005
Q-PAA3	5,73 : 1	Q1-2	-	1284	247,2 ± 8,6	0,239 ± 0,002
Q-PAA4	4,78 : 1	Q1-3	4	572,2	147,4 ± 1,3	0,153 ± 0,018
Q-PAA5	2,39 : 1	Q1-4	4	352,4	114 ± 0,8	0,080 ± 0,03
Q-PAA6	2,87 : 1			352,4	106,4 ± 1,5	0,182 ± 0,011
Q-PAA7	6,94 : 1			352,4	110,5 ± 3,1	0,188 ± 0,021
Q-PAA8	20,83 : 1			352,4	258,7 ± 5,1	0,288 ± 0,011
Q-PAA9	2,87 : 1	Q2	14	2278	211,7 ± 2,7	0,170 ± 0,028
Q-PAA10	6,94 : 1	Q2-4		893,5	142,1 ± 2,9	0,191 ± 0,014
Q-PAA11	20,83 : 1			893,5	621,2 ± 37,2	0,321 ± 0,032

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 12), se observa que empleando Q1-1 a Q1-4 el tamaño de las partículas obtenidas se encuentran en el rango $106,4 \pm 1,5$ a $258,7 \pm 5,1$ nm, mientras que con Q2 y Q2-4 el tamaño de las partículas se encuentran en el rango $142,1 \pm 2,9$ a $621,2 \pm 37,2$ nm. Sin embargo, se debe comentar que no se puede relacionar los diámetros efectivos promedio con los diferentes pesos moleculares de las muestras de quitosano, debido a que durante la síntesis de estas soluciones coloidales, para la gran mayoría, fue imposible mantener constante la relación en peso de quitosano/poliaspartato porque se observó la formación de precipitado.

Con respecto, a las soluciones coloidales sobrenadante preparadas con Q1-0 a Q1-4 se observa en la Tabla 12 que el diámetro efectivo promedio de las partículas preparadas empleando Q1-0 y Q1-4 son $116,1 \pm 0,3$ y $106,4 \pm 1,5$ a $114 \pm 0,8$ nm, respectivamente, siendo estos valores menores a los que se obtienen con Q1-1, Q1-2 y Q1-3 cuyos valores son $145,1 \pm 4,5$; $247,2 \pm 8,6$ y $147,4 \pm 1,3$ nm, respectivamente. Por otro lado, se hace la comparación de los diámetros efectivo promedio de las partículas sintetizadas con Q1-4 variando la relación en peso de quitosano/poliaspartato, siendo estas relaciones 2,39 : 1; 2,87 : 1; 6,94 : 1 y 20,83 : 1, observándose que cuando la relación es 20,83 : 1 el diámetro efectivo promedio de las partículas es $258,7 \pm 5,1$ nm, mayor a los que se observa con las relaciones de menor valor (2,39 : 1; 2,87 : 1 y 6,94 : 1), en este caso, ubicándose los diámetros efectivos promedio entre $106,4 \pm 1,5$ y $114 \pm 0,8$ nm.

Con respecto, a las soluciones coloidales sobrenadante preparadas con Q2-4, se obtiene el menor diámetro efectivo promedio $142,1 \pm 2,9$ nm (Q-PAA10). Por otro lado, nuevamente, se observa que cuando se emplea una mayor relación en peso quitosano/poliaspartato, en este caso 20,83 : 1 (Q-PAA11), se obtiene el mayor valor del diámetro efectivo promedio $621,2 \pm 37,2$ nm.

Adicionalmente, se debe mencionar que la solución de poliaspartato es agregada sobre la solución de quitosano porque al agregar las soluciones en este orden se obtendrían partículas más pequeñas de acuerdo a lo reportado en la literatura.²⁹ En la práctica esto fue comprobado al añadir las soluciones en el orden inverso, es decir la solución del quitosano (Q2-4) sobre el poliaspartato empleando la relación en peso quitosano/poliaspartato (mg/mg) igual a 6,94 : 1, obteniéndose un diámetro efectivo promedio de $516,5 \pm 35,6$ nm (Anexo 2), este valor es aproximadamente 4 veces mayor que al añadir las soluciones en el orden original ($142,1 \pm 2,9$ nm, Q-PAA10).

Por último, se debe mencionar que los resultados obtenidos por DLS son valores sobreestimados debido a que el quitosano se hincha en medio acuoso.⁴ Es decir el tamaño de las partículas, realmente, deben poseer un valor menor como se observa en el análisis TEM (Figura 65).

Análisis AFM

En la Figura 64 se observa la imagen AFM de las partículas de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10.

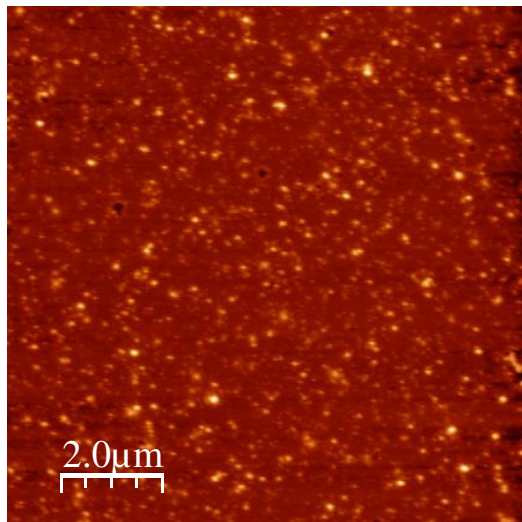


Figura 64. Imagen AFM de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10

En la Figura 64 se observa que las partículas de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10 poseen una morfología aproximadamente esférica y homogénea.

Análisis TEM

En la Figura 65 se observa la imagen TEM de la solución coloidal sobrenadante correspondiente a Q-PAA10. Estas partículas de Q-PAA10 poseen una forma casi esférica coincidiendo con el resultado de AFM, y estas tres imágenes TEM de magnificación 15000 y 50000X corresponde al tamaño de las partículas que varía relativamente entre 60 a 209 nm.

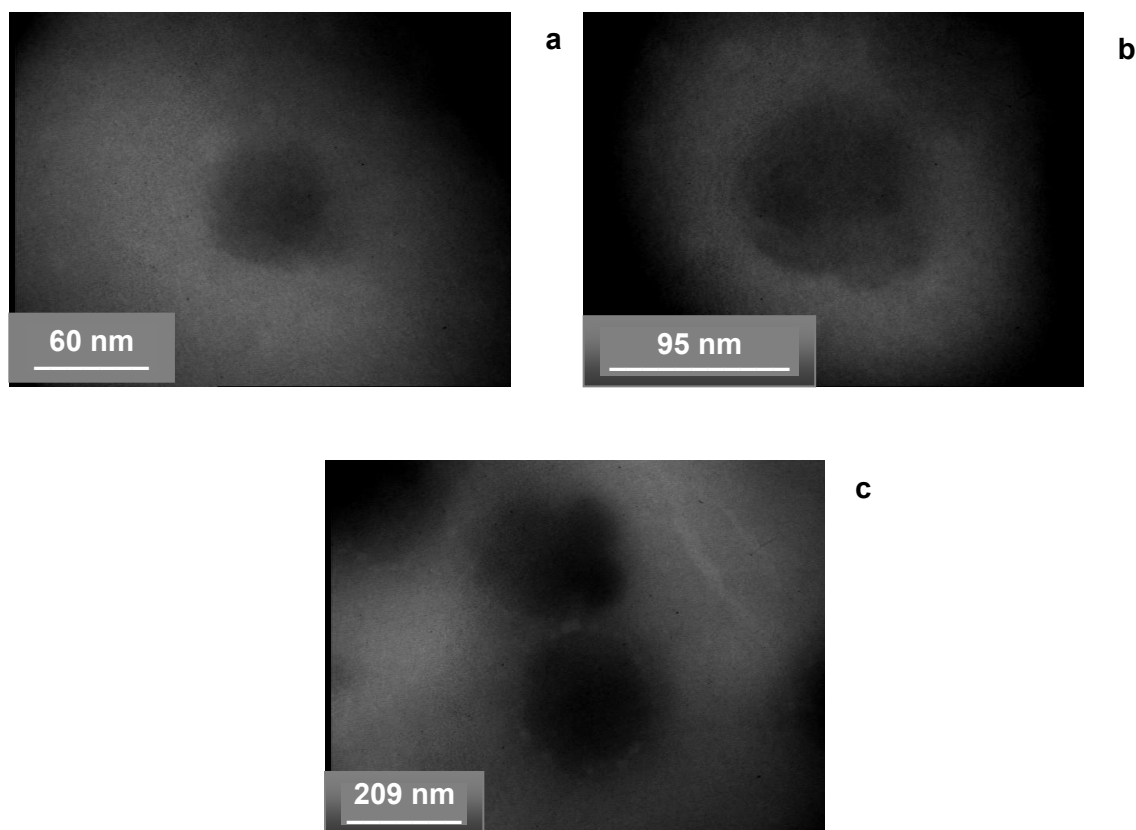


Figura 65. Imágenes TEM de la solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10 a dos magnificaciones a) y b) 50000 y c) 15000X

7.5.2. Partículas sólidas (Secado a 40 °C y liofilización)

7.5.2.1. Secado a 40 °C

La solución coloidal sobrenadante de Q-PAA10 es secado a 40 °C en placas petri (Q-PAA10s) para evitar una mayor aglomeración de las partículas como ocurre en la liofilización, favoreciendo la solubilidad del complejo interpolimérico (Q-PAA, en HCl 0,1 M) permitiendo de esta manera un mejor análisis espectrofotométrico.

Caracterización

Espectroscopia Infrarroja

En la Figura 66 se observa el espectro IR (KBr) de Q-PAA10s. A partir de este resultado se establecerá que en solución coloidal se ha formado el complejo interpolimérico objetivo.

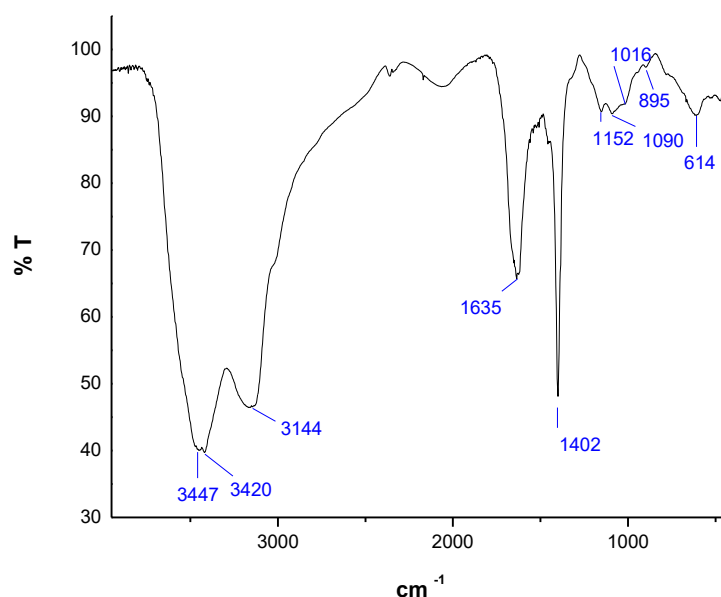


Figura 66. Espectro IR (KBr) de Q-PAA10s

En el espectro IR en pastilla (KBr) de Q-PAA10s se observa que de 1100 - 900 cm^{-1} y 1600 - 1400 cm^{-1} aparecen los picos característicos del quitosano y del poliaspartato, respectivamente. La vibración de estiramiento asimétrico C=O del grupo COO^- y la flexión N-H de la amida II del poliaspartato y la señal de deformación N-H del grupo amino protonado (δNH_3^+) del quitosano, aparece como una sola señal superpuesta a 1635 cm^{-1} . Además, la vibración de estiramiento simétrico C=O del grupo COO^- del poliaspartato es visto a 1402 cm^{-1} . Las vibraciones de estiramiento del enlace glucosídico -C-O-C, del C-O del esqueleto del anillo y la señal de meneo N-H del grupo amino del quitosano aparecen a 1152 - 1090 cm^{-1} , 1016 y 895 cm^{-1} , respectivamente. Por otro lado, los picos 3447 - 3420 y 3144 cm^{-1} se asignan a los estiramientos N-H y O-H, y a los estiramientos asimétrico y simétrico del C-H del grupo CH_2 , respectivamente, del quitosano y poliaspartato.

Finalmente, para fines de una mejor visualización de la formación del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, en la Figura 71 se observa la comparación del espectro IR (ATR) del complejo interpolimérico liofilizado, del poliaspartato y del quitosano a partir del cual se concluye que efectivamente ocurre una interacción electrostática entre el quitosano y el poliaspartato.

Análisis SEM

En la Figura 67 se observa las imágenes SEM de Q-PAA10s a dos magnificaciones 80 y 500X. Además, se hace la comparación con las imágenes SEM del Q2-4 (magnificación 80X) y del poliaspartato (magnificación 500X).

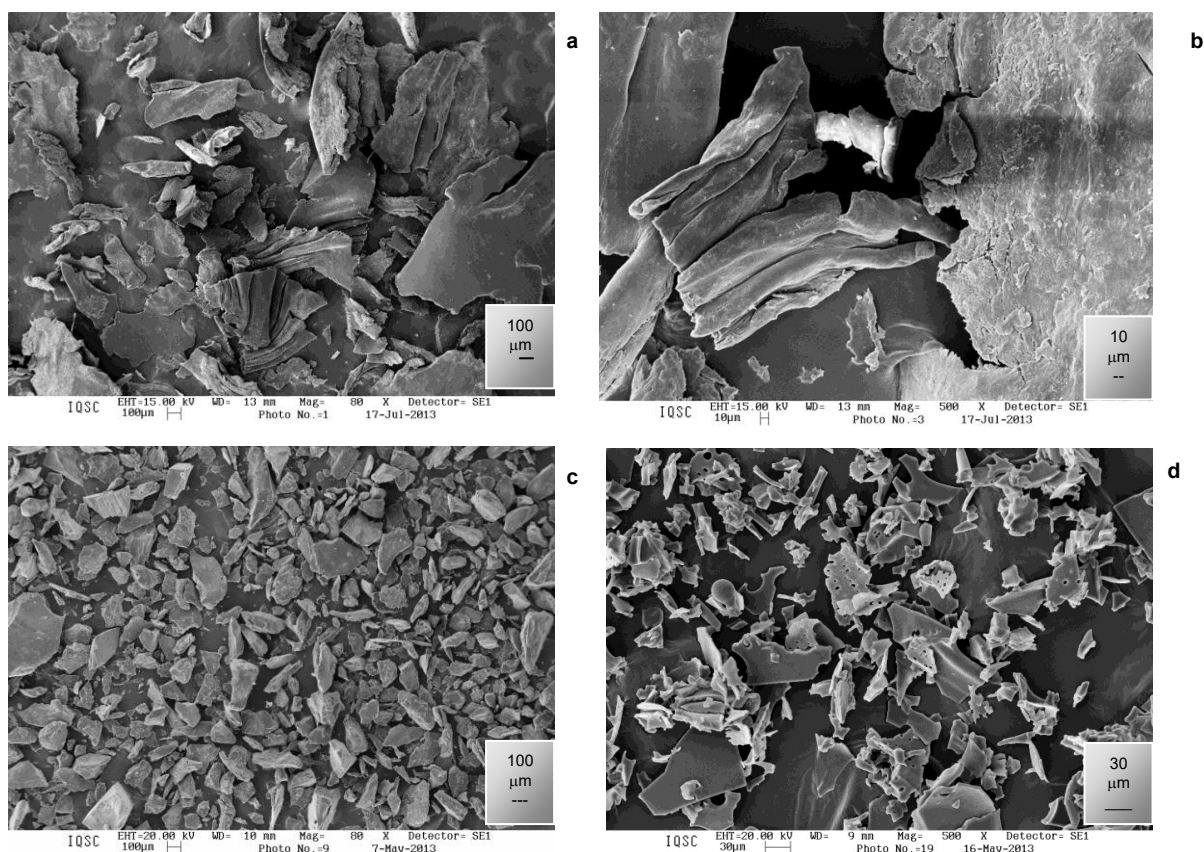


Figura 67. Imágenes SEM comparativo de Q-PAA10s, a dos magnificaciones 80 (a) y 500X (b) con Q2-4 a una magnificación de 80X (c) y con el poliaspartato a una magnificación de 500X (d)

En la Figura (67-a y 67-b) se observa que el tamaño de Q-PAA10s a dos magnificaciones 80 y 500X, se encuentra en la escala de micrómetros debido al aglomeramiento de estas durante el secado. Además, a una magnificación de 80X se observa que Q-PAA10s posee una morfología no homogénea e irregular. Por otro lado, a una magnificación de 500X se evidencia de manera más clara que Q-PAA10s presenta zonas corrugadas muy similar al poliaspartato (Figura 67-d), sin embargo no es porosa. En la Figura 67-a se observa que Q-PAA10s posee una morfología y textura muy similar al quitosano (Figura 67-c) porque en su síntesis se emplea mayor proporción de este polímero.

Análisis DRX

En la Figura 68 se observa el difractograma de rayos X comparativo de Q-PAA10s con el quitosano (Q2-4) y poliaspartato.

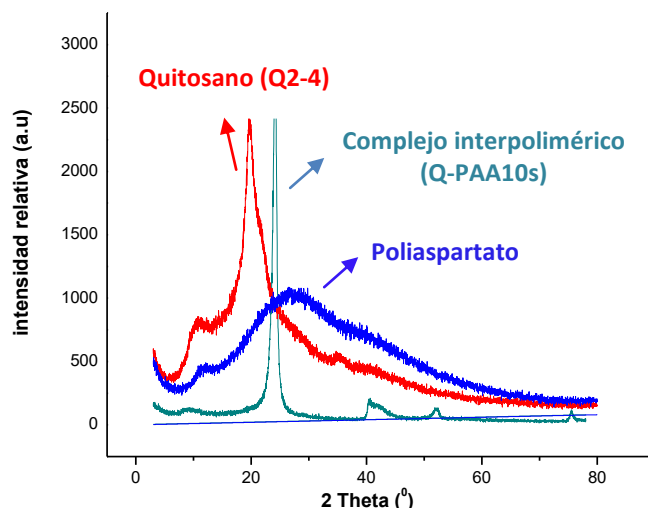


Figura 68. Difractograma de rayos X de Q-PAA10s, Q2-4 y poliaspartato

En la Figura 68 se observa que el difractograma de rayos X de Q2-4 presenta dos caídas de reflexión a $2\theta = 11$ y 20° correspondientes a una banda de menor intensidad y a un pico de mayor intensidad, respectivamente, característicos del β -quitosano, comprobándose que a pesar que el β -quitosano ha estado expuesto en condiciones ácidas durante un mes, no se ha transformado en α -quitosano. El cual presenta dos picos intensos a $9,24$ y $19,44^\circ$, y tres picos de baja intensidad a $12,8$; $23,4$ y $26,58^\circ$ (Figura 69)¹³⁶. Los dos picos intensos le confieren una mayor cristalinidad al compararlo con el β -quitosano, el cual posee solo un pico intenso a 20° (Figura 68). Asimismo, en Q-PAA10s se observa la existencia de cinco caídas de reflexión a $2\theta = 9$; 24 ; 40 ; 52 y $75,5^\circ$. Siendo, el pico a 24° más angosto que el pico del quitosano a 20° , esta observación y la evidencia que el complejo interpolimérico no presenta la naturaleza amorfa del poliaspartato (el cual presenta dos bandas, una intensa a 28° y otra de menor intensidad a 12°) indica que en el complejo interpolimérico existe un incremento de sus zonas cristalinas y que la estructura cristalina del quitosano y del poliaspartato ha sido alterada después de combinar ambos polímeros vía interacciones electrostáticas.

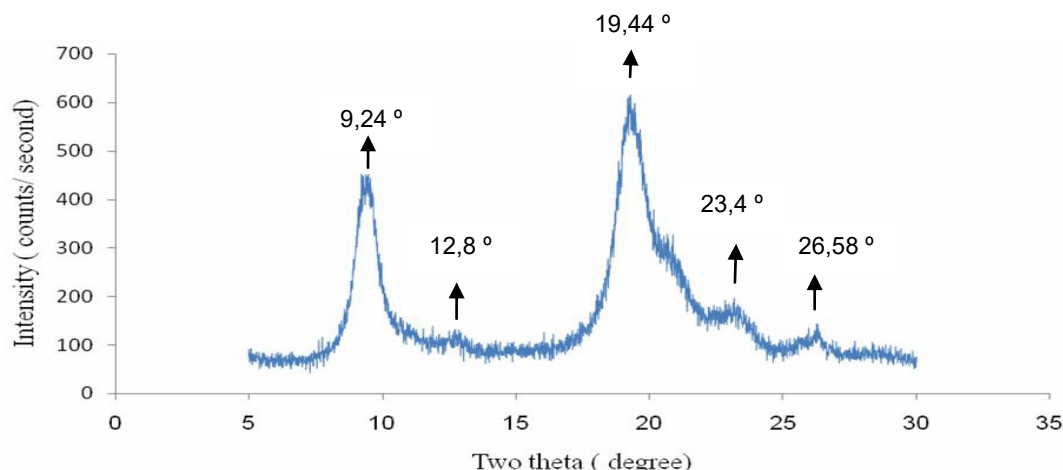


Figura 69. Difractograma de rayos X del α -quitosano.^{136,137}

Resuspensión en agua

En la Figura 70 se observa la resuspensión en agua de Q-PAA10s (1,9 mg en 1,5 mL de agua), con un tiempo de sonicación de 30 minutos.

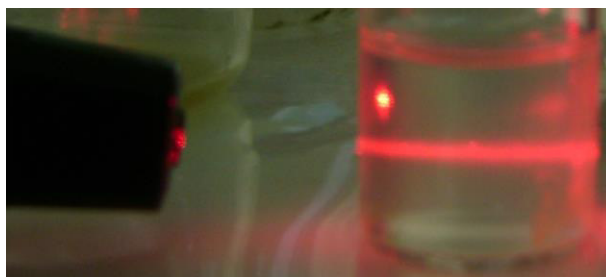


Figura 70. Resuspensión en agua de Q-PAA10s (1,9 mg en 1,5 mL de agua)

En la Figura 70, se observa que Q-PAA10s se encuentra resuspendido en agua (efecto Tyndall) después de haber sido expuesto a sonicación por 30 minutos. Por otro lado, esta solución fue analizada por DLS (Anexo 3) en el cual se observa que el diámetro efectivo promedio es $535,9 \pm 9,4$ nm y la polidispersidad es $0,345 \pm 0,026$. El diámetro efectivo promedio es aproximadamente cuatro veces más que el tamaño de las partículas de la solución coloidal quitosano-poliácido aspártico en la solución matriz en medio CH_3COOH 1 % v/v ($142,1 \pm 2,9$ nm) debido a que la resuspensión fue realizada en medio acuoso y en este medio el quitosano se hincha y las partículas

tienden a aglomerarse como se observa en la imagen STEM del encapsulamiento resuspendido en agua (Figura 84 – b).

7.5.2.2. Liofilización

En la Tabla 13 se muestra el porcentaje de rendimiento obtenido de los complejos interpoliméricos quitosano-poliácido aspártico liofilizados, sintetizados de acuerdo a la Tabla 3 del capítulo anterior.

Tabla 13. Rendimiento de la síntesis del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico liofilizados.

Código	Relación WQuitosano/ WPoliaspartato (g/g)	Quitosano		Poliaspartato	Complejo interpolimérico	Rendimiento
		Código	W (g)	W (g)	W (g)	%
Q-PAA/L1	2,83 : 1	Q1-0	0,425	0,15	0,421	73,2
Q-PAA/L2	7,08 : 1	Q1-1	0,531	0,075	0,297	49
Q-PAA/L3	5,67 : 1	Q1-2	0,425	0,075	0,167	33,4
Q-PAA/L4	4,72 : 1	Q1-3	0,354	0,075	0,194	45,2
Q-PAA/L5	2,36 : 1	Q1-4	0,3542	0,1502	0,117	23,2
Q-PAA/L6	2,83 : 1	Q2	0,425	0,1503	0,326	56,7

En la Tabla 13 se observa que el rendimiento de los seis complejos interpoliméricos liofilizados es variable, obteniéndose el menor valor 23,2 % para Q-PAA/L5. Sin embargo, se obtiene un valor moderadamente alto 73,2 % para Q-PAA/L1.

Por otro lado, el porcentaje de rendimiento del complejo interpolimérico Q-PAA10s es 41 %, el cual también representa un valor moderado así como los complejos interpoliméricos liofilizados (23,2 a 73,2 %). En ambos casos, el moderado rendimiento podría deberse a que después del secado, la muestra es lavada y secada nuevamente ocasionando pérdidas de la muestra.

Caracterización

Espectroscopia infrarroja

En la Figura 71 se observa el espectro IR (ATR) comparativo de Q-PAA/L5, del poliaspartato y de Q1-4.

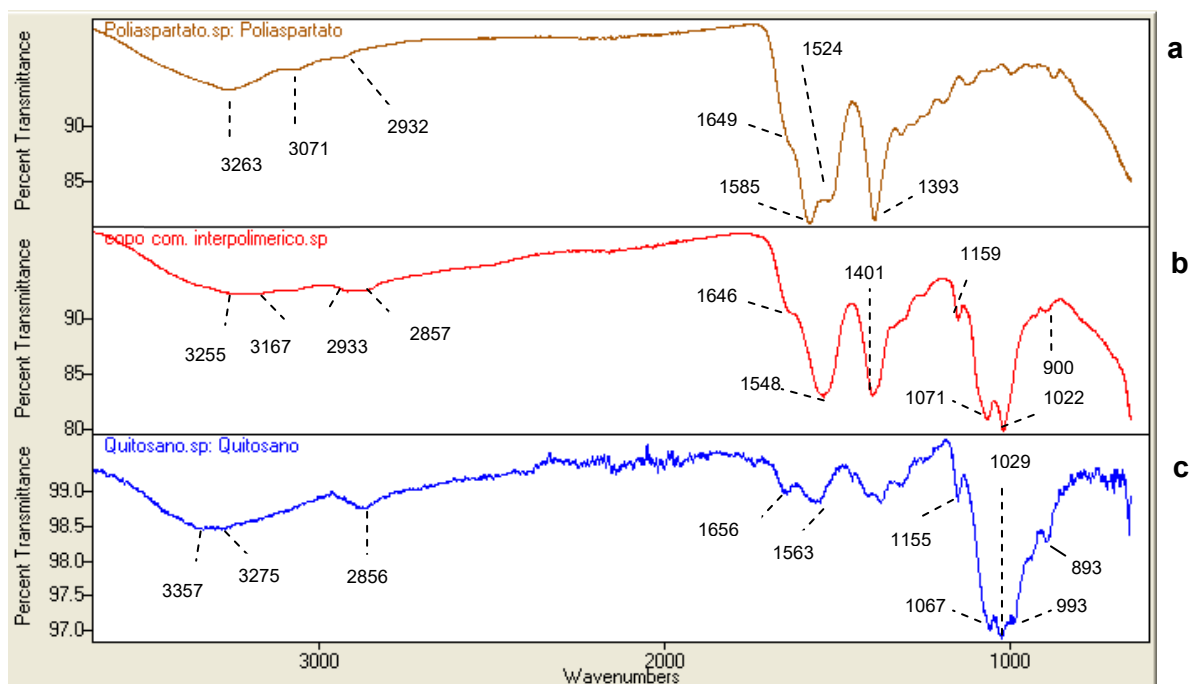


Figura 71. Comparación de los espectros IR (ATR) del poliaspartato (a), Q-PAA/L5 (b) y Q1-4 (c)

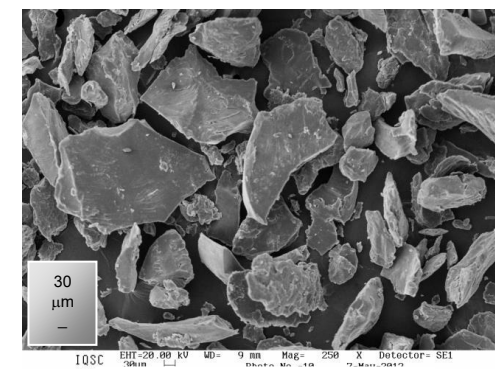
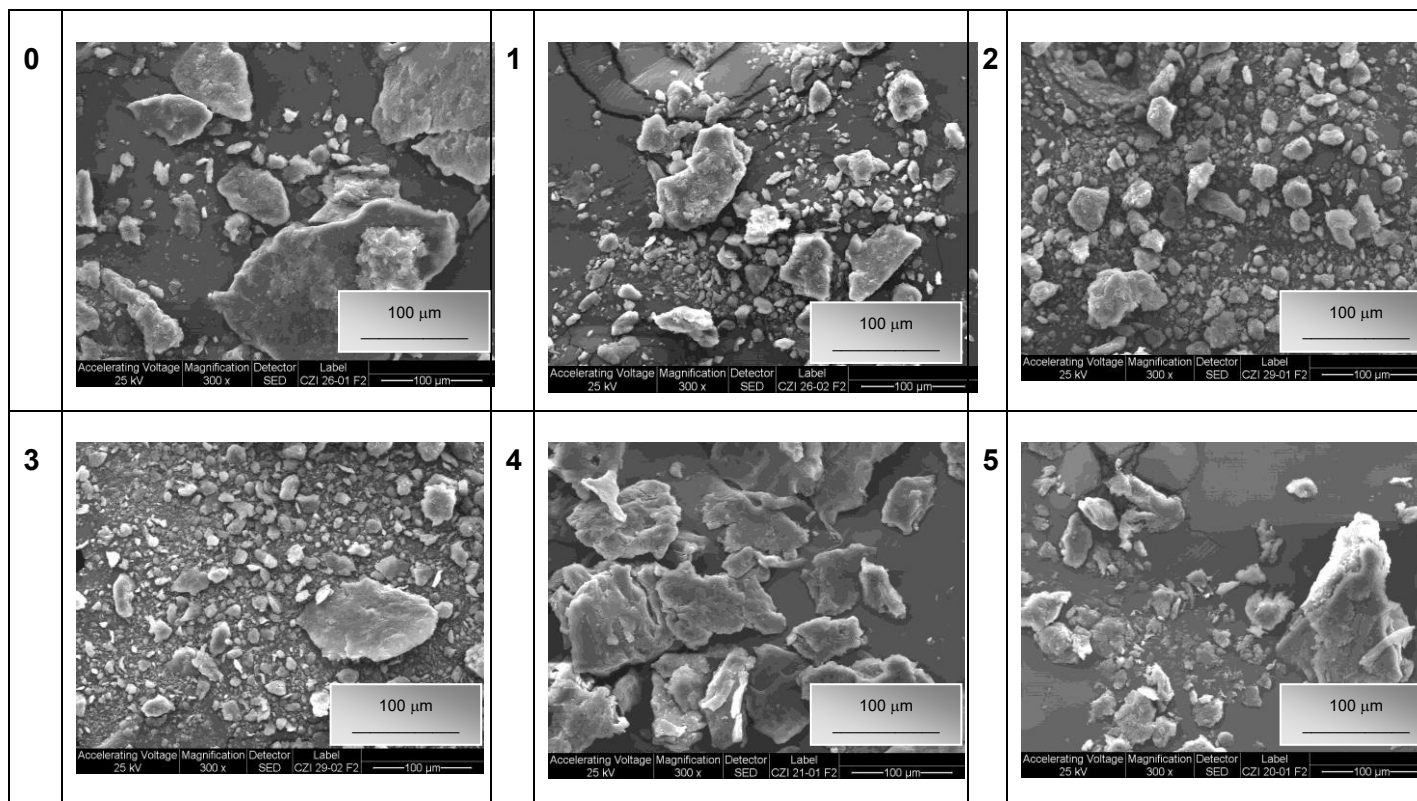
En los espectros IR, en el rango de 1700 a 800 cm^{-1} , se observa que el complejo interpolimérico posee los picos característicos del poliaspartato y del quitosano. Se observa que la vibración de estiramiento asimétrico $\text{C}=\text{O}$ del grupo COO^- (1585 cm^{-1}), la flexión N-H de la amida II (1524 cm^{-1}) del poliaspartato y la absorción de 1563 cm^{-1} correspondiente a la deformación N-H del grupo amino protonado (δNH_3^+) en el quitosano, se encuentran desplazados (superpuestos) en el complejo interpolimérico a 1548 cm^{-1} . Además, la vibración de estiramiento simétrico $\text{C}=\text{O}$ del grupo COO^- del poliaspartato (1393 cm^{-1}) se desplaza, en el complejo interpolimérico, a 1401 cm^{-1} . Asimismo, las vibraciones de estiramiento del enlace glucosídico (1155 y 1067 cm^{-1}) y de la vibración del anillo y meneo N-H del grupo amino (893 cm^{-1}) del quitosano se desplazan, en el complejo interpolimérico, a 1159 y 1071 , y 900 cm^{-1} , respectivamente,

mientras que las vibraciones de estiramiento del C-O del esqueleto del anillo (1029 cm^{-1}) y del C-O del alcohol primario -C-OH (993 cm^{-1}) del quitosano se superponen a 1022 cm^{-1} en el complejo interpolimérico. Por otro lado, en el espectro IR del complejo interpolimérico, el pico en el rango $3255 - 3167\text{ cm}^{-1}$ se asignan a los estiramientos N-H y O-H. Las absorciones 2933 y 2857 cm^{-1} se asignan a los estiramientos asimétrico y simétrico del C-H del grupo CH_2 , respectivamente.

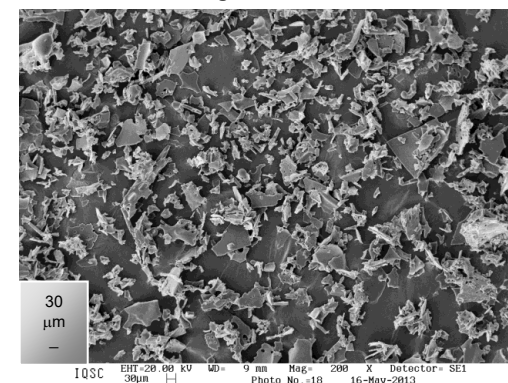
Análisis SEM

En las Figuras 72 y 73 se presentan a las imágenes SEM de los 6 complejos interpoliméricos liofilizados (Tablas 3 y 13), a dos magnificaciones 300 y 2500X. En el Anexo 4 se muestran las imágenes SEM a las magnificaciones de 150, 500 y 1000X. Las imágenes 0, 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a Q-PAA/L1, Q-PAA/L2, Q-PAA/L3, Q-PAA/L4, Q-PAA/L5 y Q-PAA/L6, respectivamente.

En las Figuras 72 y 73 se evidencia que a las magnificaciones de 300 y 2500X las partículas poseen un tamaño en micrómetros debido a que las partículas se han aglomerado durante el proceso de liofilización. Asimismo, a la magnificación de 300X se observa que la morfología de cada complejo interpolimérico liofilizado es muy similar entre sí, las cuales poseen una forma homogénea irregular en forma de granos y hojuelas. Además, al compararlo con las imágenes SEM del quitosano y poliaspartato, se evidencia que la forma de las partículas del complejo interpolimérico es similar a las del quitosano lo que se explica que en su preparación se empleó este polímero en mayor proporción (Tablas 3 y 13). Asimismo, a una magnificación de 1000 (Anexo 4) y 2500X (Figura 73) se observa mucho mejor la aglomeración de las partículas.



**SEM del quitosano a
una magnificación de 250X**



**SEM del poliaspartato a
una magnificación de 200X**

Figura 72. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 300X

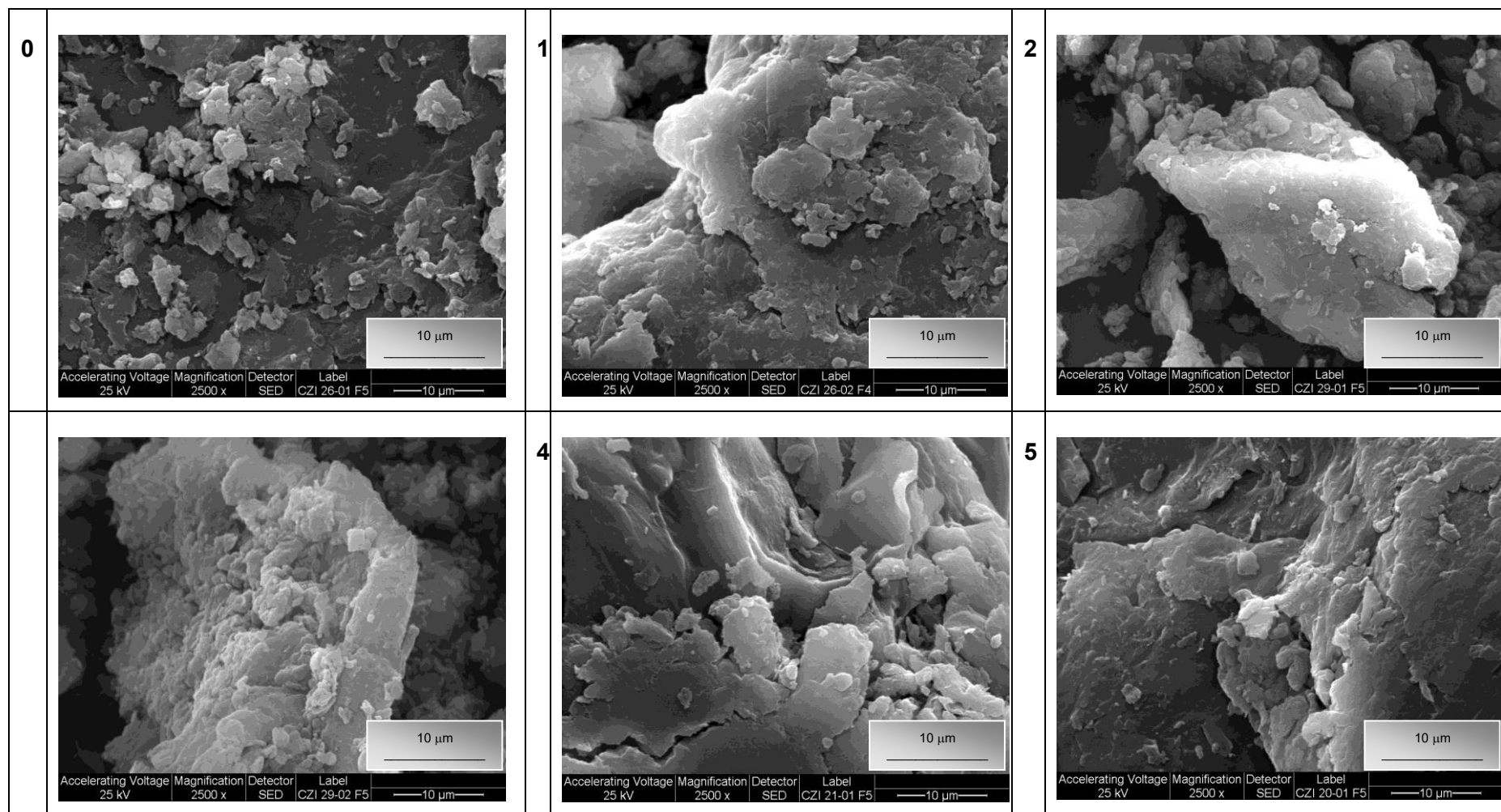


Figura 73. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 2500X

7.5.2.3. Comparación de las imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado y secado a 40 °C en placas petri

En la Figura 74 se observa las partículas del complejo interpolimérico liofilizado y secado a 40 °C en placas petri a las magnificaciones de 500, 1000 y 2500X. En el Anexo 5 se muestran las imágenes SEM a las magnificaciones de 100 y 150X. Los complejos interpoliméricos liofilizado (Q-PAA/L5) y secado a 40 °C en placas petri, preparados con el mismo quitosano, Q1-4, empleando la relación en peso de quitosano/poliaspartato 2,36 : 1, poseen una morfología diferente entre si debido a que durante el secado en placas petri la aglomeración de las partículas ocurre en menor grado que en el proceso de liofilización.

En la Figura 74, a las magnificaciones de 500, 1000 y 2500X se observa la estructura filamentosa (aparentemente de fácil desprendimiento) del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico secado a 40 °C y la estructura compacta y dura de las partículas liofilizadas.

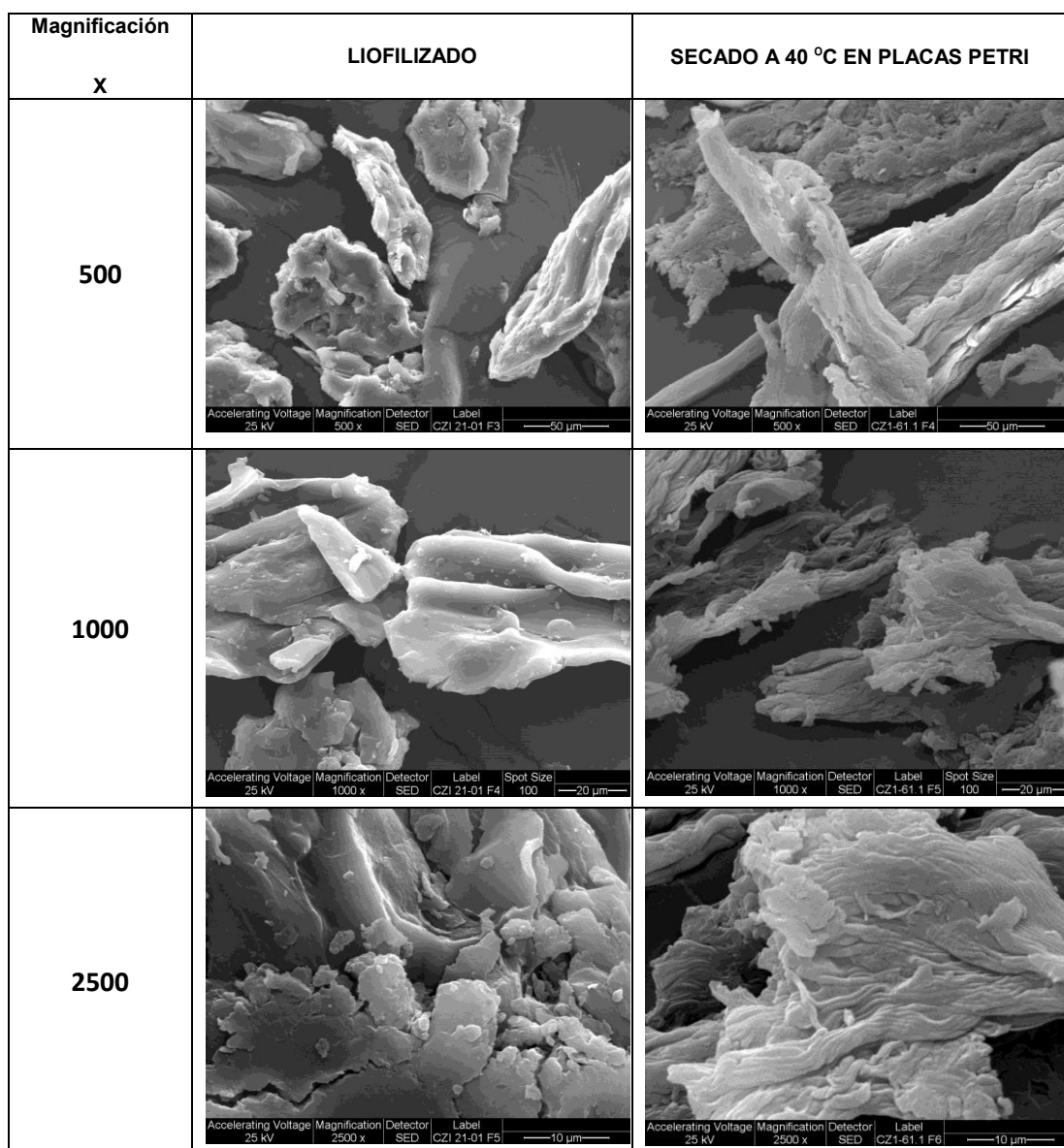


Figura 74. Comparación de las imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado (Q-PAA/L5) y secado a 40 °C en placas petri

7.6. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico

7.6.1. Solución coloidal

7.6.1.1. Síntesis

En el presente trabajo, se decide realizar los ensayos de encapsulamiento de la isoniazida en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico empleando

Q2-4, porque empleando este polímero en la preparación de las soluciones coloidales del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, utilizando la relación en peso de quitosano/poliaspartato (mg/mg) 6,94 : 1, se obtiene el menor diámetro efectivo promedio de $142,1 \pm 2,9$ nm como se observa en la Tabla 12.

Por otro lado, el encapsulamiento de la isoniazida en el complejo interpolimérico se preparó, primero, agregando la isoniazida a la solución acuosa del poliaspartato de pH 7, porque esta droga es muy soluble en agua y al pH mencionado anteriormente. Luego, la solución de poliaspartato que contiene la droga se agrega sobre la solución de quitosano para obtener partículas de menor tamaño como se discutió en 7.5.1.2.

En el capítulo anterior, se mostró en la Tabla 4 que se realizaron cuatro ensayos preliminares de encapsulamiento de isoniazida en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico empleando la relación en peso de isoniazida/quitosano (mg/mg) de 6 : 1; 1 : 1; 0,7 : 1 y 0,5 : 1.

Se decide trabajar en relación con el peso del quitosano y no del poliaspartato para evitar problemas en la cuantificación de la droga objetivo porque la cantidad de isoniazida en relación con el peso del quitosano sería relativamente alto en comparación a lo que se emplearía en relación con el peso del poliaspartato.

7.6.1.2. Caracterización

Las soluciones coloidales de isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico fueron ultracentrifugadas a 4 °C siendo las soluciones sobrenadantes analizadas por DLS, AFM y TEM. Se debe indicar que se obtuvo una cantidad de pellet no cuantificable con exactitud, siendo un valor aproximado de 1 mg.

Análisis DLS

En la Tabla 14 se observa el diámetro efectivo promedio de las partículas de cada ensayo preliminar de encapsulamiento. Asimismo, la distribución del tamaño de las partículas de cada solución coloidal se encuentra en el Anexo 6.

Tabla 14. Resultados DLS del diámetro efectivo de las partículas de Quitosano-Poliácido aspártico conteniendo Isoniazida

Código de la solución coloidal de isoniazida encapsulada en Q-PAA	Peso de isoniazida / peso de quitosano (mg/mg)	% Teórico de Isoniazida en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico	Análisis por DLS	
			Diámetro efectivo promedio (nm)	Polidispersidad
I/Q-PAA1	6 : 1	83,9	224,5 ± 9,3	0,269 ± 0,015
I/Q-PAA2	1 : 1	46,6	178 ± 9,6	0,294 ± 0,018
I/Q-PAA3	0,7 : 1	37,9	184,1 ± 1,1	0,223 ± 0,003
I/Q-PAA4	0,5 : 1	30,4	148,5 ± 1	0,221 ± 0,004

En la Tabla 14 se observa que de los ensayos preliminares, las partículas de mayor tamaño ($224,5 \pm 9,3$ nm) corresponde a la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) de 6 : 1, mientras que el menor tamaño $148,5 \pm 1$ nm corresponde al encapsulamiento con la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) de 0,5 : 1. Además el tamaño de estas últimas partículas no varía mucho con respecto al tamaño de las partículas del complejo interpolimérico Q-PAA10, cuyo diámetro efectivo promedio es $142,1 \pm 2,9$ nm (Tabla 12). Entonces, a menor porcentaje de isoniazida en el encapsulamiento (30,4 %, valor teórico) corresponde un menor tamaño de la partícula ($148,5 \pm 1$ nm). Por otro lado, este último valor es mayor al encontrado por TEM (25 a 134 nm, Figura 76) debido a que por el análisis DLS el quitosano se hincha por encontrarse en medio acuoso.

Análisis AFM

En la Figura 75 se presentan las imágenes AFM de las soluciones coloidales sobrenadante del complejo interpolimérico Q-PAA10 y de los encapsulamientos I/Q-PAA2, I/Q-PAA3 y I/Q-PAA4.

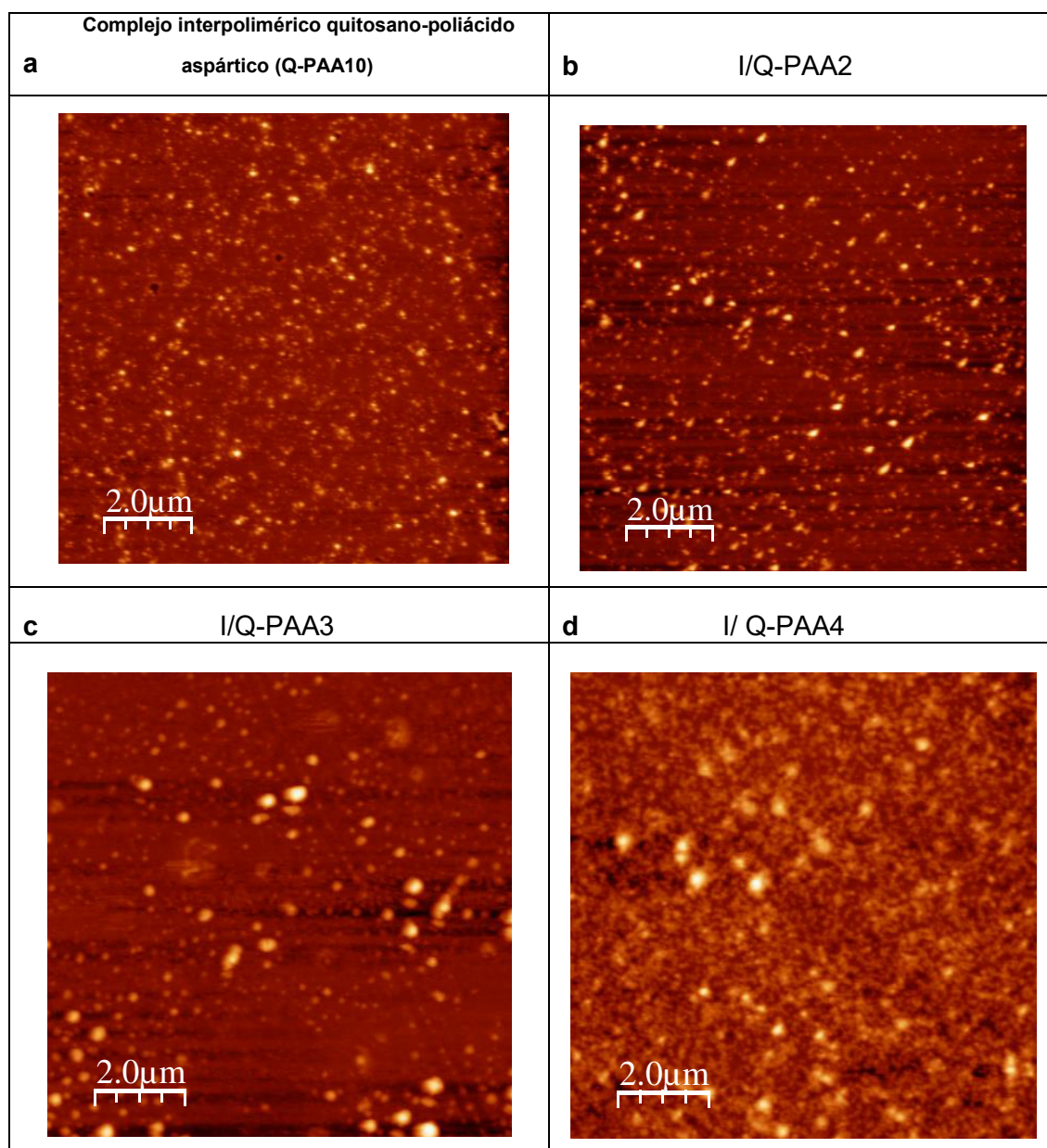


Figura 75. Comparación de las imágenes AFM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico (Q-PAA10) (a), I/Q-PAA2 (b), I/Q-PAA3 (c) e I/Q-PAA4 (d)

En estas imágenes, la morfología predominante de 75-a es prácticamente esférica y homogénea. Mientras que, en las imágenes 75-b, 75-c y 75-d se evidencian formas esférica y ovalada pero heterogénea.

Análisis TEM

En la Figura 76 se observa las imágenes TEM de la solución coloidal sobrenadante de I/Q-PAA4 a diferentes magnificaciones.

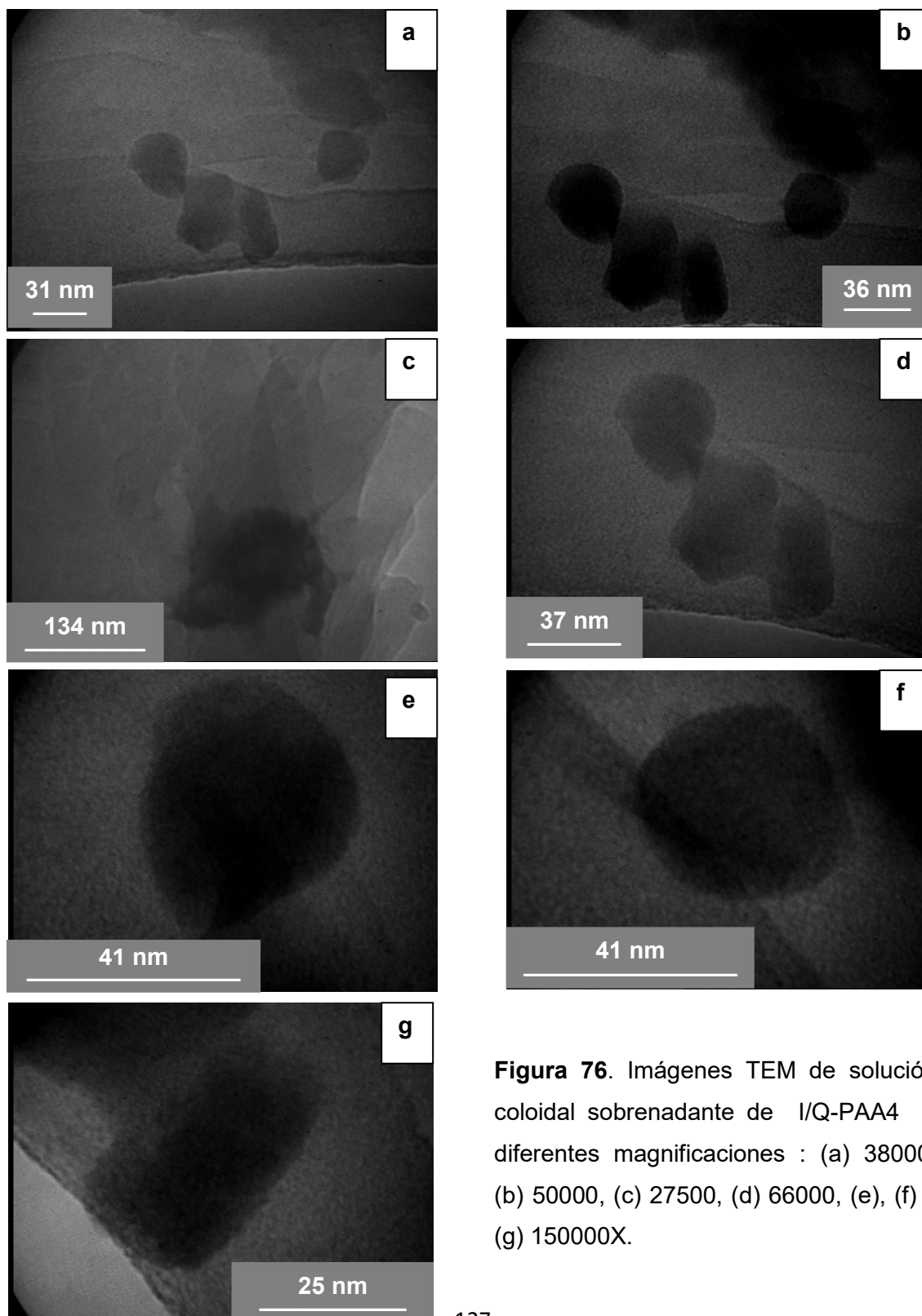


Figura 76. Imágenes TEM de solución coloidal sobrenadante de I/Q-PAA4 a diferentes magnificaciones : (a) 38000, (b) 50000, (c) 27500, (d) 66000, (e), (f) y (g) 150000X.

En la Figura 76 se observa que las partículas de I/Q-PAA4 poseen forma esférica y alargada no bien definidas. El diámetro se encuentra entre 25 a 134 nm. Asimismo, se observa que poseen menor tamaño que el complejo interpolimérico Q-PAA10 (60 a 209 nm), Figura 65.

7.6.2. Partículas sólidas

Las soluciones coloidales sobrenadante de los encapsulamientos I/Q-PAA1; I/Q-PAA2 (por duplicado) e I/Q-PAA4 fueron secadas para su posterior caracterización. Las soluciones coloidales fueron secadas en placas petri y no por liofilización debido a que por este último proceso las partículas se aglomeran en mayor grado ocasionando una probable disminución de la solubilidad del encapsulamiento en HCl 0,1 M, lo cual representaría un serio problema para el proceso de cuantificación. Las muestras fueron secadas a 20 °C, mientras que el duplicado de la solución coloidal sobrenadante de I/Q-PAA2 fue secado a 40 °C. Los sólidos obtenidos son I/Q-PAA1s; I/Q-PAA2s₂₀ (secado a 20 °C); I/Q-PAA2s₄₀ (secado a 40 °C) e I/Q-PAA4s, correspondiente a las soluciones coloidales I/Q-PAA1; I/Q-PAA2 (por duplicado) e I/Q-PAA4, respectivamente. Las muestras que son secadas a 20 °C poseen un color amarillo verdoso tenue, mientras que la muestra que es secada a 40 °C posee un color amarillo verdoso negruzco como se observa en la Figura 77.

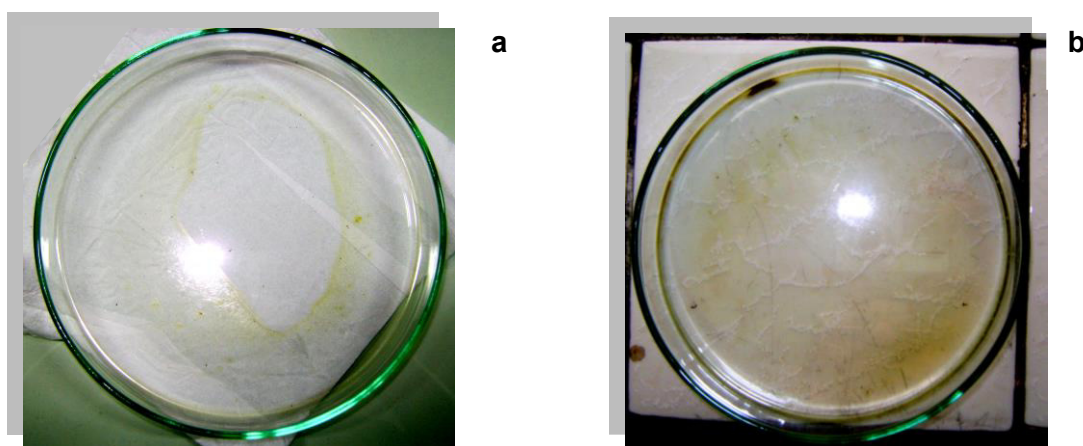


Figura 77. Isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico secadas en placas petri a 20 °C (a) y 40 °C (b)

Se decide caracterizar los encapsulamientos secados a 20 °C porque en la literatura se encuentra reportado que la isoniazida se descompone, principalmente, en ácido isonicotínico bajo un medio ácido (Ejm. HCl 0,1 M), sobre todo, cuando está expuesto al calor (Figura 79).^{138,139}

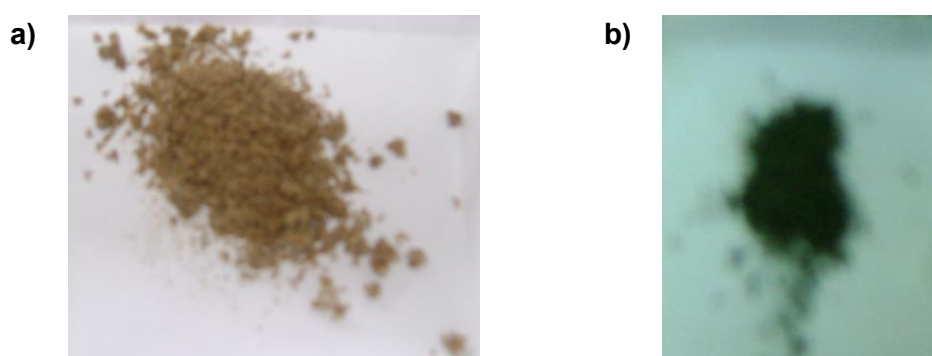


Figura 78. Partículas sólidas de isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico (I/Q-PAA) secadas a 20 °C (a) y 40 °C (b)

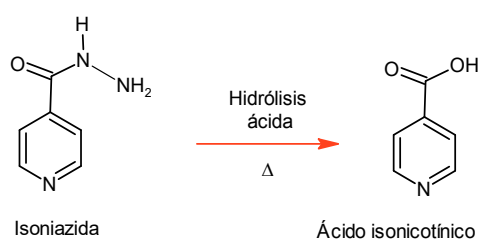


Figura 79. Degradación de la isoniazida por hidrólisis ácida y calor.^{138,139}

129

hidrólisis, se podría reemplazar el CH_3COOH 1 % por otros ácidos más fuertes como una solución de HCl , H_2SO_4 o emplear otros métodos como radiación gamma, etc. Además, con quitosanos de bajo peso molecular se podría obtener partículas mucho más pequeñas del encapsulamiento y del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico.

7.6.2.1. Caracterización

La caracterización de I/Q-PAA4s permitirá concluir si efectivamente la isoniazida se encuentra encapsulada dentro del complejo interpolimérico.

Espectroscopia infrarroja

En la Figura 80 se presenta el espectro IR, en pastilla de KBr, comparativo de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/Q-PAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s.

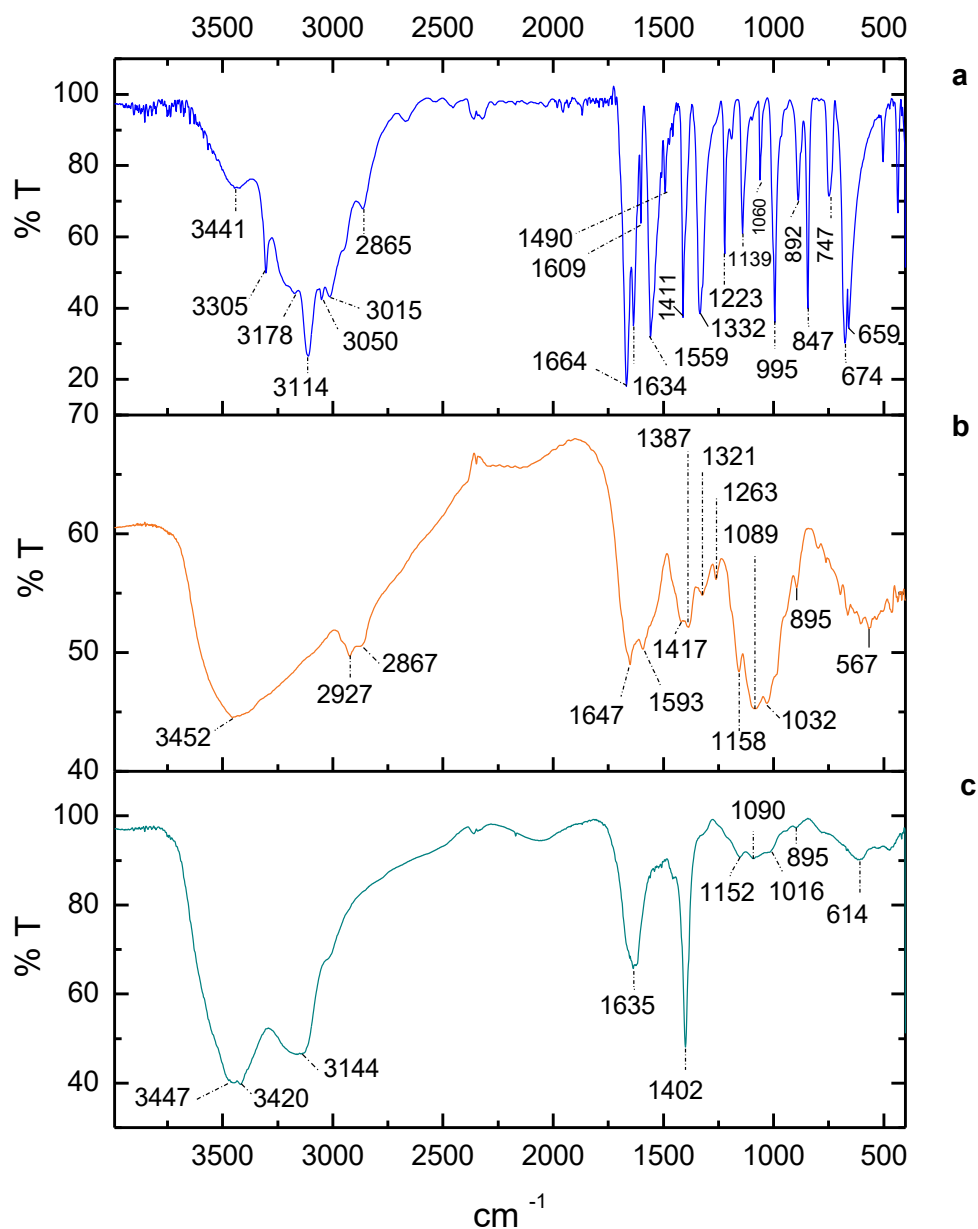


Figura 80. Comparación de los espectros IR (KBr) de la droga libre isoniazida (a), del encapsulamiento I/Q-PAA4s (b) y del complejo interpolimérico Q-PAA10s (c)

En la Figura 80 - c se observa que en el rango de 1670 a 600 cm^{-1} hay un cambio del espectro IR del complejo interpolimérico en el encapsulamiento. Se observa que el pico que aparece a 1635 cm^{-1} en el IR del complejo interpolimérico perteneciente a la superposición del estiramiento asimétrico C=O del grupo COO^- , la flexión N-H de la amida II del poliaspartato y la deformación N-H del grupo amino protonado (δNH_3^+) del quitosano, se desdobra, en el encapsulamiento, en las señales 1647 y 1593 cm^{-1}

(Figura 80 - b) debido a la presencia de la isoniazida cuyos picos responsables de este desdoblamiento en la droga libre aparecen a $1664 - 1634 \text{ cm}^{-1}$ (estiramiento C=O del grupo amida y flexión N-H del grupo NH_2)¹⁴⁰, $1609 - 1559 \text{ cm}^{-1}$ (estiramiento del anillo)¹⁴⁰ y 1490 cm^{-1} (flexión C-H del anillo)¹⁴⁰ (Figura 80 - a).

Asimismo, la señal a 1402 cm^{-1} presente en el complejo interpolimérico (estiramiento simétrico C=O del grupo COO^- del poliaspartato) (Figura 80 - c) se desdobra, en el encapsulamiento, en $1417, 1387, 1321$ y 1263 cm^{-1} (Figura 80 - b) y también su intensidad disminuye por la presencia de la droga, cuyos picos responsables de este efecto aparecen en la droga libre a 1411 y 1332 cm^{-1} (Figura 80 - a) pertenecientes a las señales flexión C-H del anillo y al meneo N-H del grupo NH_2 , respectivamente.¹⁴⁰

Por otro lado, la señal del complejo interpolimérico $1152 - 895 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 80 - c), asignados a las señales de estiramiento del enlace glucosídico $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$, del C-O del esqueleto del anillo y a la señal de meneo N-H del grupo amino del quitosano, aumenta su intensidad en el encapsulamiento (1158 a 895 cm^{-1} , Figura 80 - b) debido a la presencia de la droga cuyas señales responsables de este incremento de intensidad aparecen en la isoniazida libre a $1223, 1139, 1060, 995$ y 892 cm^{-1} (Figura 80 - a) asignados a la flexión asimétrica C-C-H del anillo, al estiramiento N-N, a la flexión del anillo, al estiramiento del anillo y al balanceo C-H del anillo, respectivamente.¹⁴⁰

Finalmente, el espectro IR del encapsulamiento en el rango de 3500 a 2500 cm^{-1} (Figura 80 - b) se parece al del complejo interpolimérico donde las señales $3452, 2927$ y 2867 cm^{-1} (Figura 80 - c) se asignan al estiramiento N-H / O-H, al estiramiento asimétrico y simétrico del C-H del grupo CH_2 , respectivamente, pertenecientes a la cadena del complejo interpolimérico.

Análisis DRX

En la Figura 81 se observa el difractograma de rayos X de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/Q-PAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s.

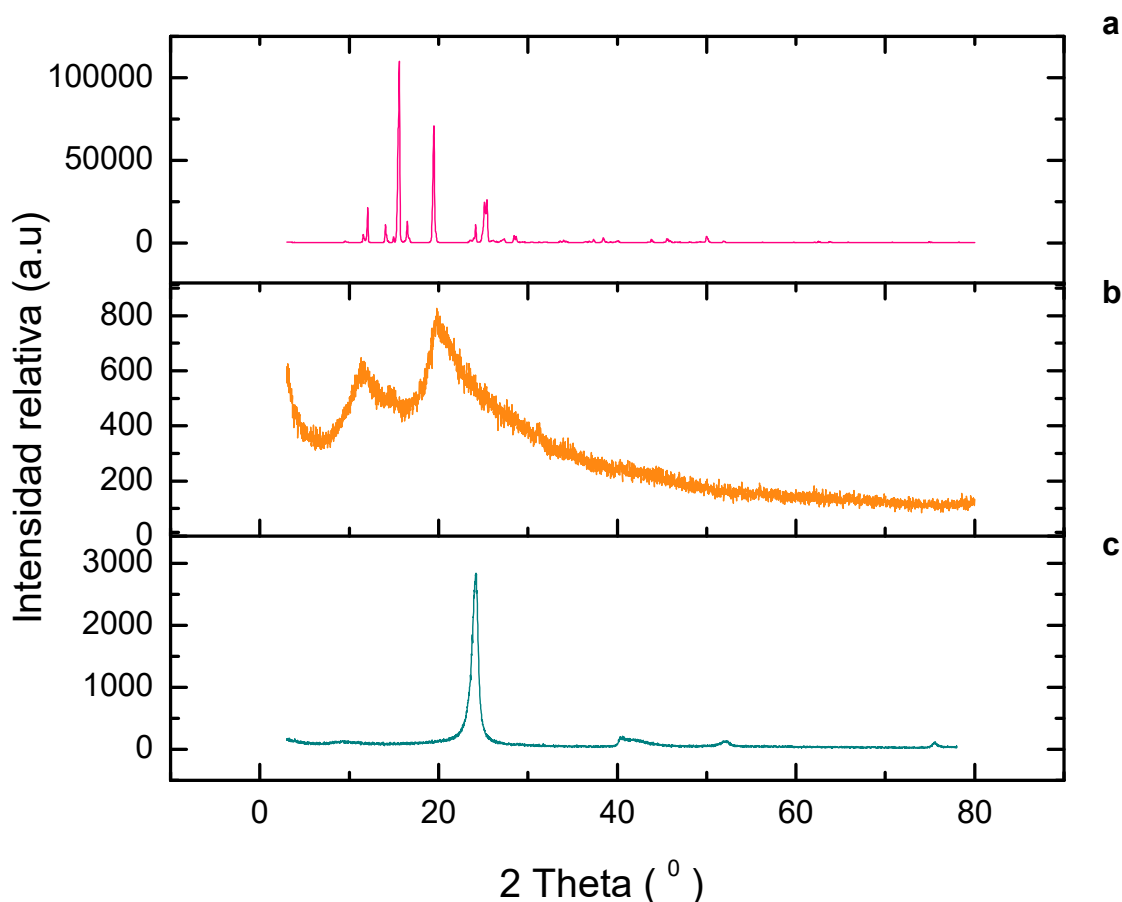


Figura 81. Difractograma de rayos X de la isoniazida libre (a), del encapsulamiento I/Q-PAA4s (b) y del complejo interpolimérico Q-PAA10s (c)

En la Figura 81 - a se observa el difractograma de rayos X de la isoniazida libre la cual presenta sus picos cristalinos característicos entre 2θ de 12; 14; 15,5; 16,5; 19,5; 24 y 25 °. Por otro lado, en la Figura 81 - c se observa el difractograma de rayos X del complejo interpolimérico el cual presenta un pico intenso y angosto a 24 °, además presenta tres caídas de reflexión a 9; 40; 52 y 75,5 ° de muy baja intensidad. En la Figura 81 - b se observa el difractograma de rayos X del encapsulamiento, el cual presenta dos intensidades a 12 y 21 ° los cuales son anchos y de muy baja intensidad, lo que indica la naturaleza amorfa del encapsulamiento y que éste está conformado por partículas más pequeñas que el complejo interpolimérico y la droga libre.

Análisis SEM

En la Figura 82 se muestra la comparación de las imágenes SEM de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/Q-PAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s a una magnificación de 80X. En el Anexo 7 se presentan las imágenes SEM de estas moléculas a diferentes magnificaciones 100, 200, 250, 500, 700, 800 y 2000X.

En la Figura 82, a la magnificación de 80X, se evidencia que el encapsulamiento posee una morfología no homogénea la cual consta de granos y una región rica de filamentos largos. La forma de filamentos (largos y uniformes en varias regiones de la muestra) puede ser visualizada con mejor claridad a las magnificaciones de 2000 y 700X (Anexo 7), mientras que la forma de granos se observa mejor a una magnificación de 800X (Anexo 7).

Por otro lado, el complejo interpolimérico, a una magnificación de 80 (Figura 82), 200 y 500X (Anexo 7), es evidenciado como granos con superficie rugosa y como láminas corrugadas con superficie lisa. Asimismo, a una magnificación de 100X (Anexo 7) la forma de lámina corrugada es vista con mayor claridad sin observarse los filamentos largos que existen en el encapsulamiento.

Finalmente, la isoniazida tiene la forma de cristales de forma moderadamente homogénea y de diferentes tamaños (magnificación de 80 (Figura 82), 250, 800 y 2000X (Anexo 7)), sin embargo, al igual que el complejo interpolimérico, no poseen la morfología de filamentos largos.

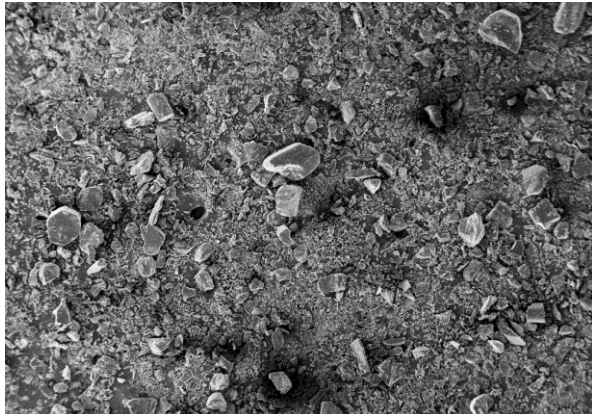
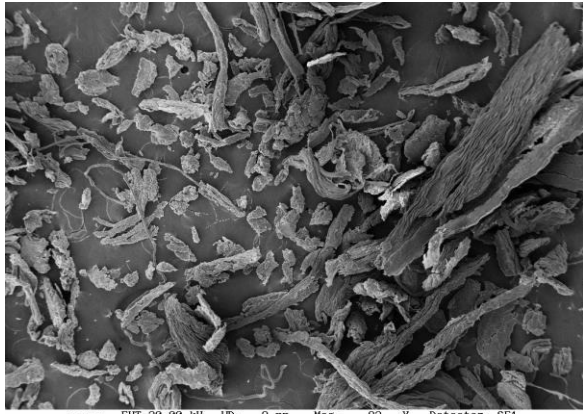
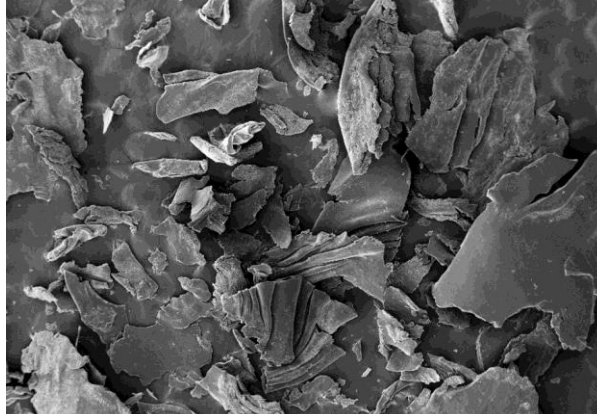
Magnificación	Isoniazida libre	Encapsulamiento I/Q-PAA4s	Complejo interpolimérico Q-PAA10
80X			

Figura 82. Comparación de las imágenes SEM de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/Q-PAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s a una magnificación de 80X

Resuspensión en agua

En la Figura 83 se observa la resuspensión en agua del encapsulamiento I/Q-PAA4s (1,9 mg en 1,5 mL de agua) después de haber sido sonicada por 30 minutos.



Figura 83. Resuspensión en agua del encapsulamiento I/Q-PAA4s (1,9 mg en 1,5 mL de agua)

En la Figura 83 se observó, que solo una parte de la muestra se encuentra en solución coloidal (efecto Tyndall), mientras que la otra parte de la muestra permanece en estado sólido (en el fondo del recipiente). Por otro lado, la solución coloidal fue analizada por DLS (Anexo 8) donde se observa que el diámetro efectivo promedio es $638,7 \pm 14,7$ nm y la polidispersidad es $0,216 \pm 0,105$. Este diámetro efectivo promedio es aproximadamente cuatro veces más que el tamaño de las partículas del encapsulamiento en la solución matriz en medio CH_3COOH 1 % v/v ($148,5 \pm 1$ nm), debido a que la resuspensión fue realizada en medio acuoso y en este medio el quitosano se hincha y las partículas tienden a aglomerarse como se observa en el análisis STEM del encapsulamiento resuspendido en agua (Figura 82 – b).

Análisis STEM

En la Figura 84 se observa las imágenes STEM del encapsulamiento I/Q-PAA4s resuspendido en etanol y agua.

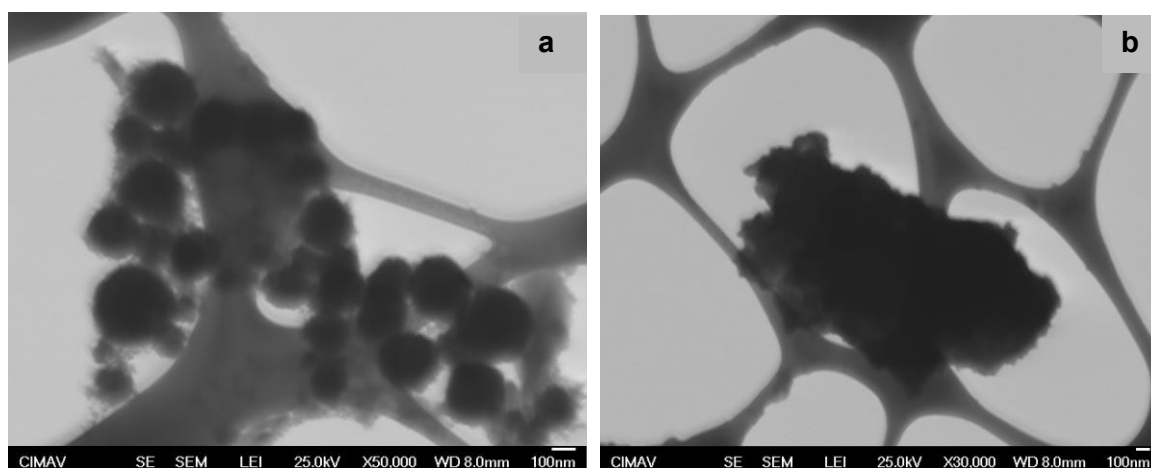


Figura 84. Imágenes STEM del encapsulamiento I/Q-PAA4s, resuspendido en etanol (a) y en agua (b)

En la Figura 84 se observa que el tamaño de las partículas del encapsulamiento I/Q-PAA4s resuspendido en etanol varía aproximadamente de 100 a 300 nm presentando una morfología prácticamente esférica con superficie no muy bien definida. Por otro lado, cuando las partículas son resuspendidas en agua, las partículas se aglomeran formando una masa compacta, de tamaño en micras, lo cual explica los resultados DLS del complejo interpolimérico Q-PAA10s y del I/Q-PAA4s resuspendidos en agua.

Análisis ESI/MS

En las Figuras 85 y 86 se observan los espectros ESI/MS, en modo positivo, de la izoniazida en medio acuoso y ácido, respectivamente.

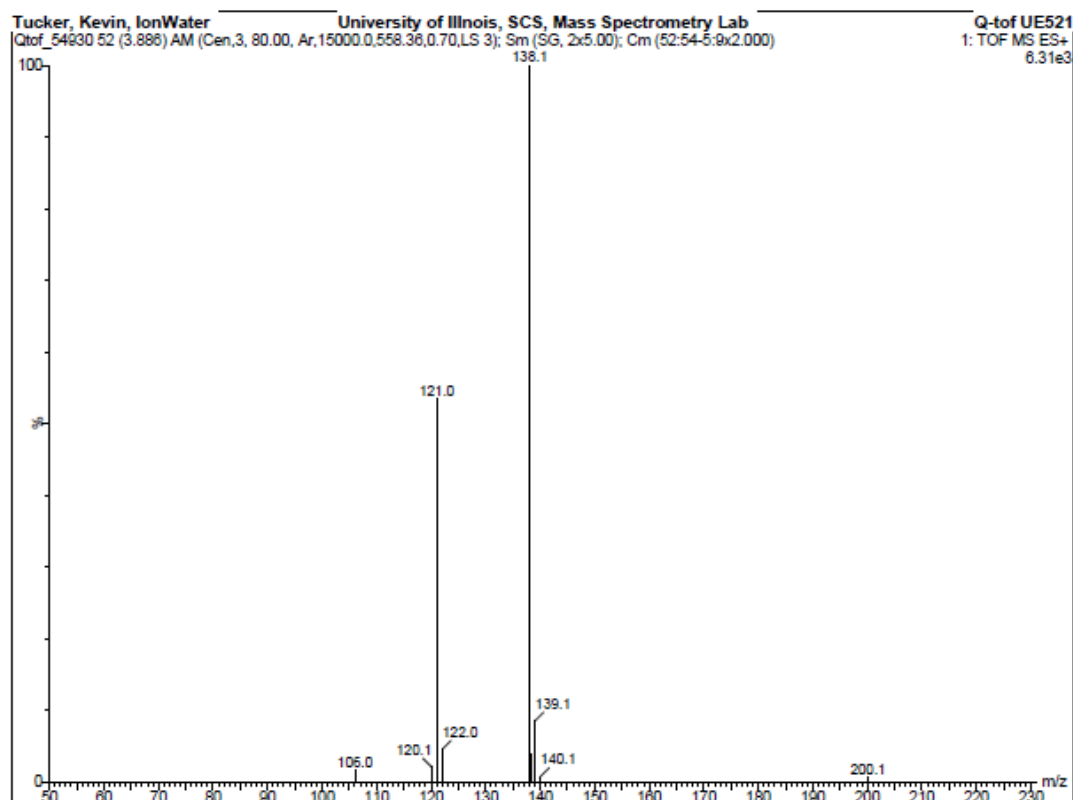


Figura 85. Espectro ESI/MS de la isoniazida en agua

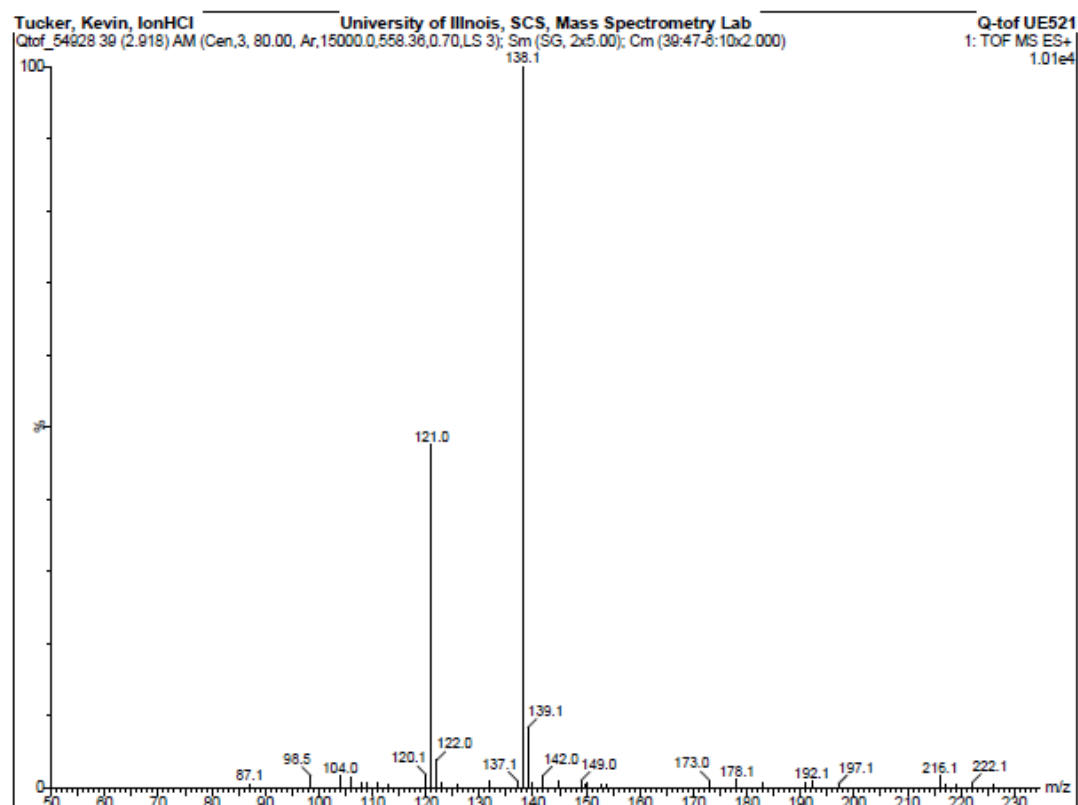


Figura 86. Espectro ESI/MS de la isoniazida en medio ácido (HCl 1 M)

En las Figuras 85 y 86 se observa que la isoniazida (P.M. = 137 g/mol) en medio acuoso y en medio ácido (HCl 1 M) presenta como pico base a 138.1 m/z perteneciente al aducto $[M+H]^+$, de igual manera presenta el pico 139.1 m/z perteneciente también al aducto $[M+H]^+$ considerando la presencia del carbono 13. De otro lado, se observa el pico de segundo mayor porcentaje, 121 m/z, perteneciente al ion mostrado en la Figura 87, producto de la fragmentación de la isoniazida.

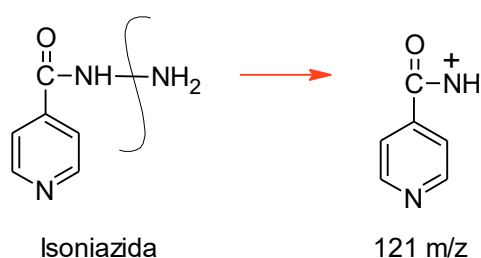


Figura 87. Fragmentación de la isoniazida

En la Figura 86 se observa que la isoniazida en medio ácido sufre una mayor fragmentación que en medio acuoso. Además, se observa que en este medio ácido no se encuentra presente el pico 124 m/z que correspondería al pico del ácido isonicotínico (P.M. = 123 g/mol), producto principal de la degradación de la isoniazida en medio ácido, sobre todo con calor, confirmándose que en medio ácido a temperatura ambiente no ocurre la descomposición de la isoniazida en ácido isonicotínico.

Por otro lado, en la Figura 88 se presenta al espectro ESI/MS en medio ácido del encapsulamiento I/Q-PAA4s. Se observa que está presente el pico 138 m/z indicando la probable presencia de isoniazida, este pico correspondería al aducto $[M+H]^+$. Por otro lado, el pico base 142 m/z y los demás picos de alto porcentaje como 149, 155, 160, 173, 183, 193.1, 205.1, 211.1, 128.1, 131.9, 126 m/z podrían corresponder a los fragmentos del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico y del encapsulamiento incorporando o no a la isoniazida o parte de ella.

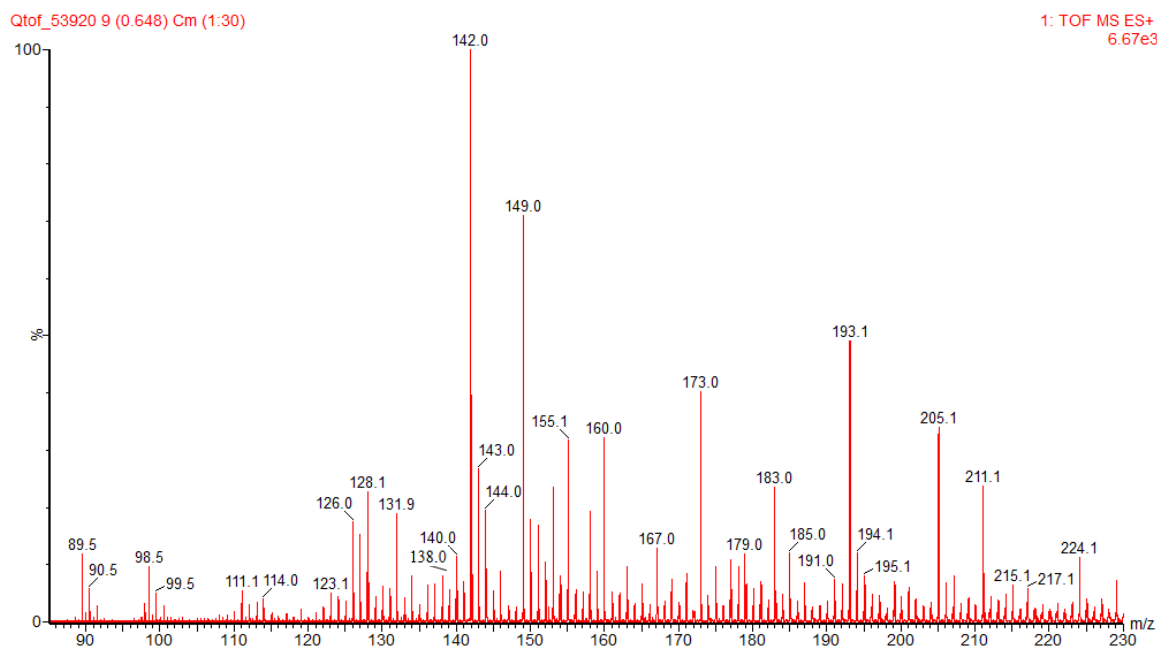


Figura 88. Espectro ESI/MS del encapsulamiento I/Q-PAA4s en medio ácido (HCl 1 M)

7.7. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)

En los ensayos de CCF de la isoniazida y el ácido isonicotínico (ver RMN- ^1H en anexo 9) disueltos en medio acuoso, desarrollado en el sistema de solvente acetato de etilo:metanol (7:3 v/v)¹⁴¹, se observa que la isoniazida y el ácido isonicotínico presentan una sola mancha donde los R_f del ácido isonicotínico y de la isoniazida son 0,49 y 0,34, respectivamente, Figura 89.

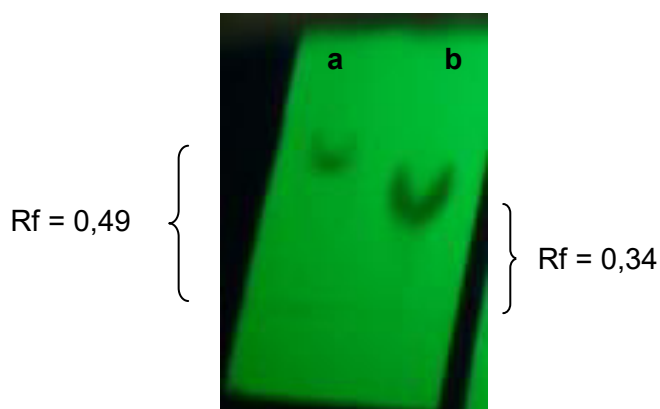


Figura 89. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y de la isoniazida (b) en medio acuoso.

Por otro lado, en la Figura 90 se muestra la imagen de la CCF de la isoniazida y el ácido isonicotínico en medio ácido (HCl 0,1 M, pH = 1-2, una hora de exposición) observándose que el ácido isonicotínico presenta tres manchas con R_f : 0; 0,24 y 0,47, mientras que la isoniazida presenta dos manchas con R_f : 0 y 0,44.

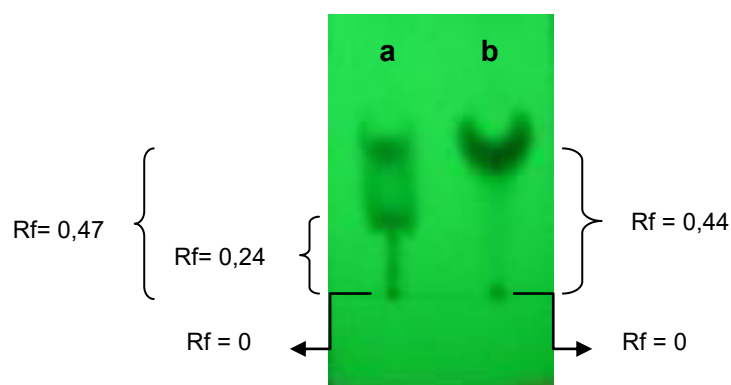


Figura 90. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y la isoniazida (b) en medio ácido (HCl 0,1 M; pH = 1-2, una hora de exposición).

En la Figura 91 se presenta la imagen de la CCF de la isoniazida y el ácido isonicotínico en CH_3COOH 1 %, pH = 4 (una hora y dos semanas de exposición), evidenciándose, para ambos tiempos, que el ácido isonicotínico y la isoniazida presentan dos manchas, sin embargo el ácido isonicotínico no muestra una mancha en la línea base ($R_f = 0$) como se observa en medio HCl 0,1 M. En el tiempo de una hora, el ácido isonicotínico posee los R_f 0,32 y 0,38, mientras que la isoniazida presenta los R_f 0 y 0,47. Del mismo modo, para dos semanas de exposición el ácido isonicotínico y la isoniazida presentan dos manchas con R_f 0,26 y 0,38; 0 y 0,44, respectivamente.

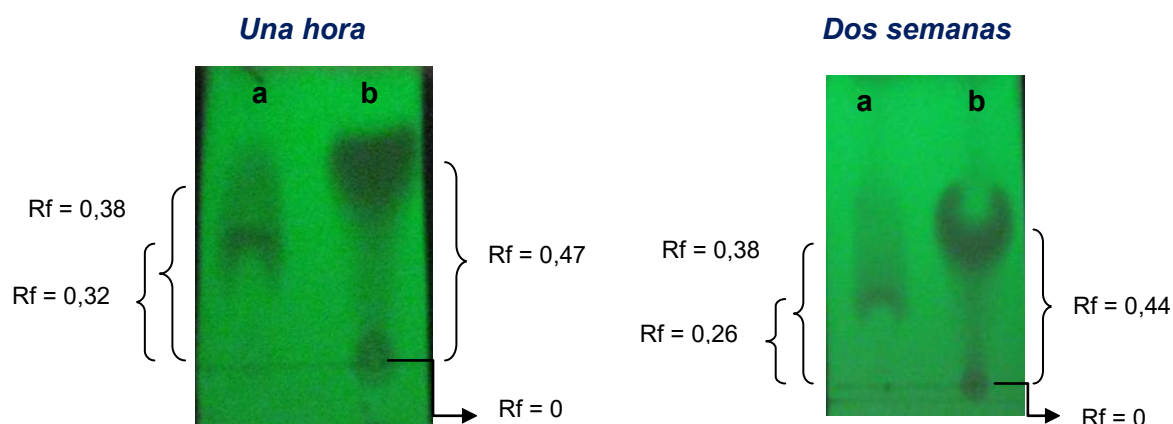


Figura 91. Imagen de la cromatografía en capa fina del ácido isonicotínico (a) y la isoniazida (b) en medio ácido (CH_3COOH 1 %; pH = 4, una hora y dos semanas de exposición).

A partir de las Figuras 90 y 91 se puede concluir que la isoniazida en medio ácido (HCl 0,1 M y CH_3COOH 1 %), a temperatura ambiente y en los tiempos estudiados no se descompone en ácido isonicotínico porque en la CCF, para la isoniazida, no se observa la mancha con R_f 0,24 y 0,26 - 0,32 característico del ácido isonicotínico en HCl 0,1 M y CH_3COOH 1 %, respectivamente. Asimismo, en CH_3COOH 1 % el ácido isonicotínico no presenta una mancha en la línea base mientras que la isoniazida si presenta una mancha con $R_f = 0$ muy intensa. Estos resultados confirman el resultado presentado en la literatura donde en un estudio de estabilidad de la isoniazida en solución acuosa a pH debajo de 8 permanece estable por 14 días a la temperatura, por ejemplo, de 25 °C.¹⁴²

El resultado de CCF en HCl 0,1 M confirma el resultado del análisis ESI/MS de la isoniazida en HCl 1 M (un medio ácido más concentrado), a las mismas condiciones: temperatura ambiente y una hora de exposición, porque en el espectro de este análisis no se observa el pico 124 m/z perteneciente al aducto $[\text{M}+\text{H}]^+$ del ácido isonicotínico.

Entonces, estos resultados de CCF de los reactivos puros de isoniazida y ácido isonicotínico en medio ácido, indicarían que durante la síntesis (medio CH_3COOH 1 %) y el análisis cuantitativo (medio HCl 0,1 M) del encapsulamiento realizados a temperatura ambiente y por una hora de exposición no ocurriría la descomposición de la isoniazida en ácido isonicotínico. Del mismo modo, no habría descomposición de la

droga en la solución coloidal del encapsulamiento mientras ésta seca en placas petri a 20 °C, estando la droga expuesta al medio CH_3COOH 1 % ($\text{pH} = 4$) por dos semanas.

Por otro lado, en la Figura 92 se observa a las imágenes de la CCF del encapsulamiento I/Q-PAA4s (a) y de la isoniazida (b), en medio ácido: HCl 0,1 M.

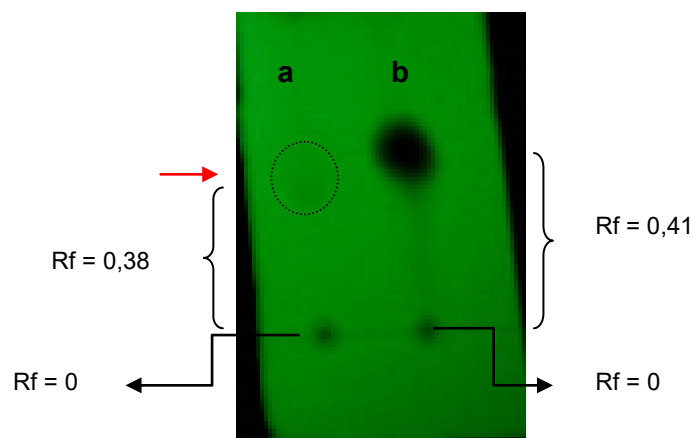


Figura 92. Imagen de la cromatografía en capa fina del encapsulamiento I/Q-PAA4s (a) y la isoniazida (b), en medio ácido (HCl 0,1 M).

En la Figura 92 se observa que el encapsulamiento (a) presenta dos manchas de $R_f : 0$ (mancha intensa) y $R_f : 0,38$ (mancha no muy perceptible). Sin embargo, esta mancha no muy perceptible tiene un R_f muy aproximado a la isoniazida ($R_f : 0,41$). A partir de lo cual se puede concluir que existe la probabilidad que la isoniazida esté presente en el encapsulamiento, confirmando, de esta manera, el resultado del análisis ESI/MS donde se observa el pico 138 m/z perteneciente, probablemente, al aducto $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la isoniazida (Figura 88). Asimismo, el hecho que la isoniazida pura y el encapsulamiento presenten una mancha con $R_f : 0$, se podría decir que esta mancha correspondería a la isoniazida protonada (Figura 93), la cual se forma por el resultado del medio ácido en que fueron disueltas. La isoniazida protonada llegaría a ser altamente polar que no llegaría a desplazarse en el sistema de solvente trabajado.

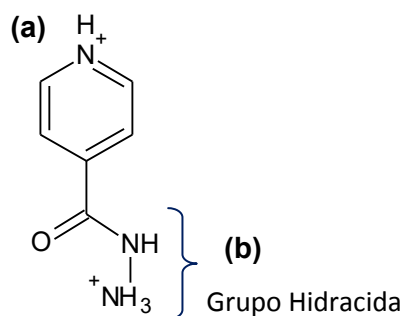


Figura 93. Protonación de la isoniazida en medio ácido: protonación del nitrógeno del anillo piridina (a) y protonación del nitrógeno del grupo -NH_2 (b)

De acuerdo a la Figura 93, en medio ácido hay dos posibles sitios de protonación de la isoniazida. El nitrógeno de la piridina (a) y el grupo -NH_2 (b) de la isoniazida. El pK del nitrógeno de la piridina es 1,8 y del grupo -NH_2 es 3,5. Debido a estos bajos valores de pK, en HCl 0,1 M, la isoniazida se encuentra protonada en ambos sitios.¹⁴³

7.8. Análisis UV-Visible

7.8.1. Determinación de la longitud de onda de trabajo de la isoniazida en medio acuoso y ácido.

Medio acuoso

En la Figura 94 se observa el espectro UV-Visible de la solución acuosa de isoniazida 0,1 mM.

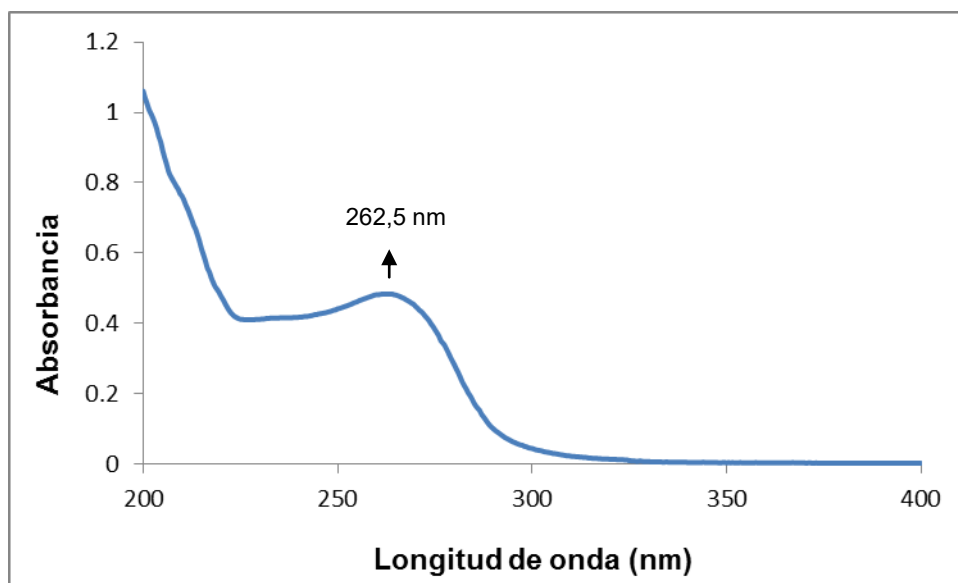


Figura 94. Espectro UV- Visible de la solución acuosa de isoniazida 0,1 mM

En la Figura 94 se observa que la máxima absorción de la isoniazida en medio acuoso es 262,5 nm, cuyo valor coincide, prácticamente con el valor reportado en la literatura (263 nm).¹⁴⁴

Medio ácido

En la Figura 95 se observa el espectro UV-Visible de la isoniazida 0,1 mM en HCl 0,1 M.

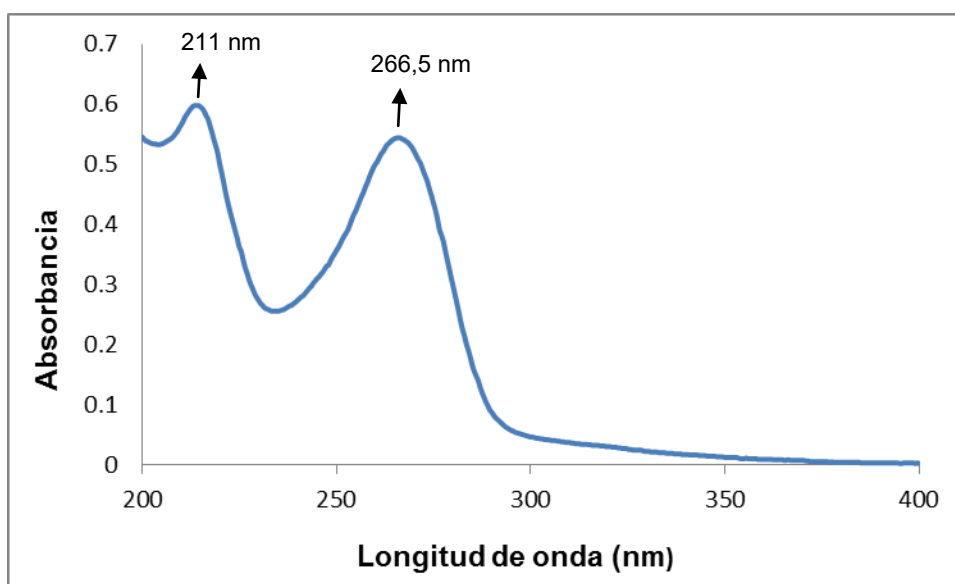


Figura 95. Espectro UV-Visible de la isoniazida 0,1 mM en HCl 0,1 M

En el espectro de la solución acuosa de la isoniazida se observa un pico a 262,5 nm pero en presencia de HCl 0,1 M el pico se desplaza a 266,5 nm con un incremento de intensidad (Figura 95), este desplazamiento indica la protonación de la isoniazida.¹⁴² Además, en la Figura 95 se observa que en el espectro de la isoniazida en medio ácido aparece una nueva absorción a 211 nm, el cual no se observa en el espectro UV-Visible de la solución acuosa de isoniazida. Asimismo, la máxima absorbancia, 266,5 nm en HCl 0,1 M, coincide, prácticamente con el valor reportado en la literatura (266 nm) en el mismo medio.¹⁴⁵

De acuerdo a lo reportado en la literatura, las absorciones a 211 y 266,5 nm de la isoniazida en medio ácido podrían corresponder a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente, del grupo hidracida de la isoniazida protonada (Figura 93).¹⁴³

Finalmente, para la identificación y cuantificación de isoniazida en el encapsulamiento se empleará la longitud de onda de 266,5 nm.

7.8.2. Determinación de la longitud de onda del ácido isonicotínico en medio acuoso y ácido.

Medio acuoso

En la Figura 96 se observa el espectro UV-Visible de la solución acuosa del ácido isonicotínico 0,1 mM.

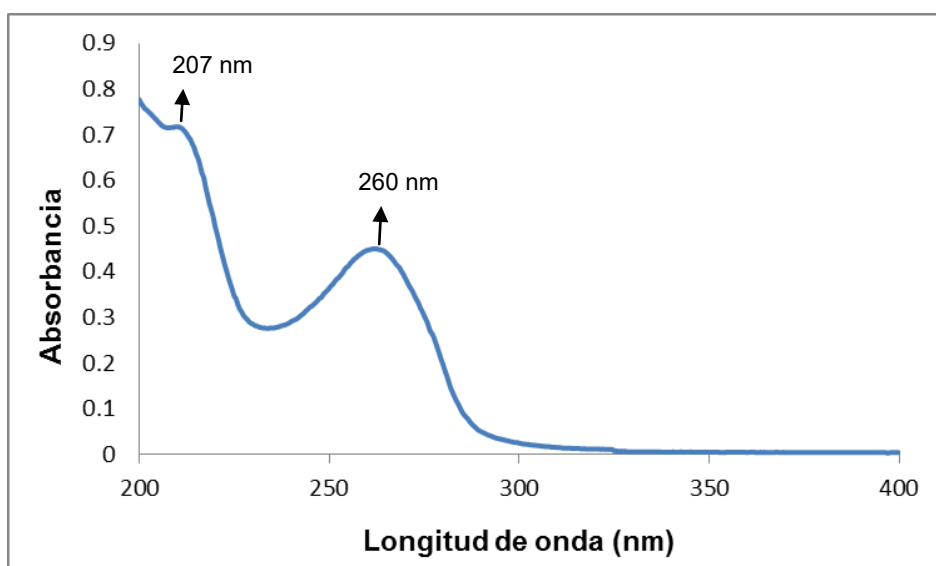


Figura 96. Espectro UV- Visible de la solución acuosa del ácido isonicotínico 0,1 mM

En la Figura 96 se observa que la máxima absorción del ácido isonicotínico en medio acuoso es 260 nm. Asimismo, se observa una pequeña absorbancia a 207 nm.

Medio ácido

En la Figura 97 se observa el espectro UV-Visible del ácido isonicotínico 0,1 mM en HCl 0,1 M.

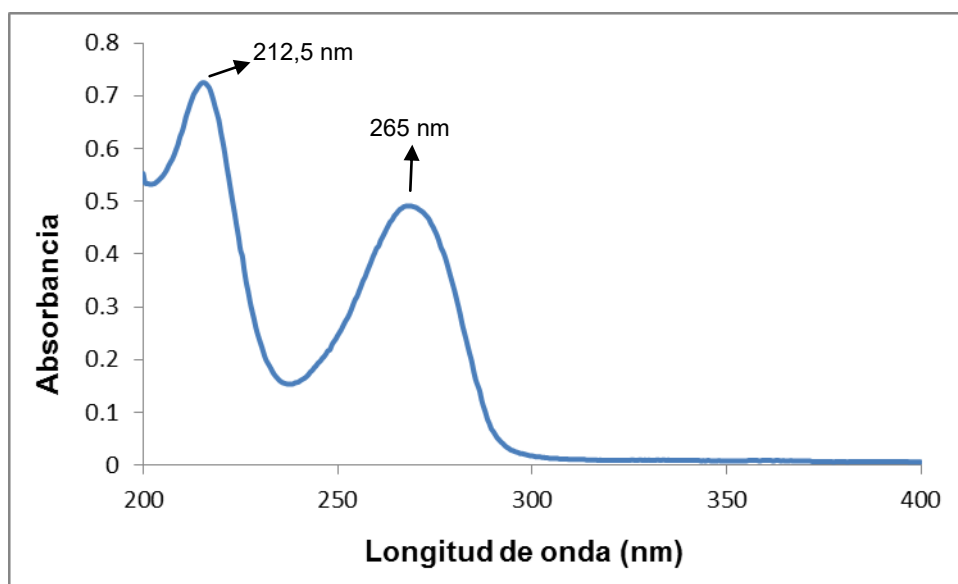


Figura 97. Espectro UV-Visible del ácido isonicotínico 0,1 mM en HCl 0,1 M

En la Figura 97 se observa que el ácido isonicotínico en medio ácido posee una máxima absorbancia a 265 nm y otra absorbancia de menor intensidad a 212,5 nm, observándose que los picos 260 y 207 nm, en el espectro de la solución acuosa del ácido isonicotínico, se desplazan a 265 y 212,5 nm, respectivamente, en HCl 0,1 M, con un incremento de intensidad. Este desplazamiento se debe a la disociación del nitrógeno del anillo piridina protonado¹⁴⁶ (Figura 98). Además, esta máxima absorbancia a 260 nm (medio acuoso) y 265 nm (medio ácido) podría asociarse a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de un electrón del enlace π en el grupo carbonilo (C=O) del grupo carboxilo a un orbital antienlazante de más alto nivel.¹⁴⁷

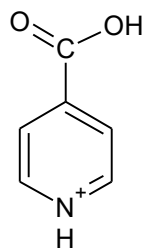


Figura 98. Protonación del nitrógeno del anillo piridina del ácido isonicotínico

Por otro lado, a partir de estas observaciones se puede concluir que el ácido isonicotínico y la isoniazida, en medio ácido, poseen longitudes de onda de absorción muy parecidas, el ácido isonicotínico: 265 nm (absorbancia máxima) y 212,5 nm (absorbancia de menor intensidad), y la isoniazida: 266,5 nm (absorbancia máxima) y 211 nm (absorbancia de menor intensidad), mientras que en medio acuoso la isoniazida solo posee una absorbancia máxima a 262,5 nm y el ácido isonicotínico posee dos absorbancias una máxima a 260 nm y otra de menor intensidad a 207 nm.

Entonces, a pesar que la isoniazida y el ácido isonicotínico poseen parecidas absorbancias en medio ácido, durante la cuantificación de la isoniazida, por UV-visible, en el encapsulamiento no existiría problemas de interferencias entre la molécula de interés y el ácido isonicotínico porque se ha demostrado previamente por CCF y ESI/MS que la isoniazida en dicho medio, a temperatura ambiente, no se descompone en ácido isonicotínico.

7.8.3. UV-Visible del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico Q-PAA10s

En la Figura 99 se observa el espectro UV-Visible del complejo interpolimérico Q-PAA10s en HCl 0,1 M.

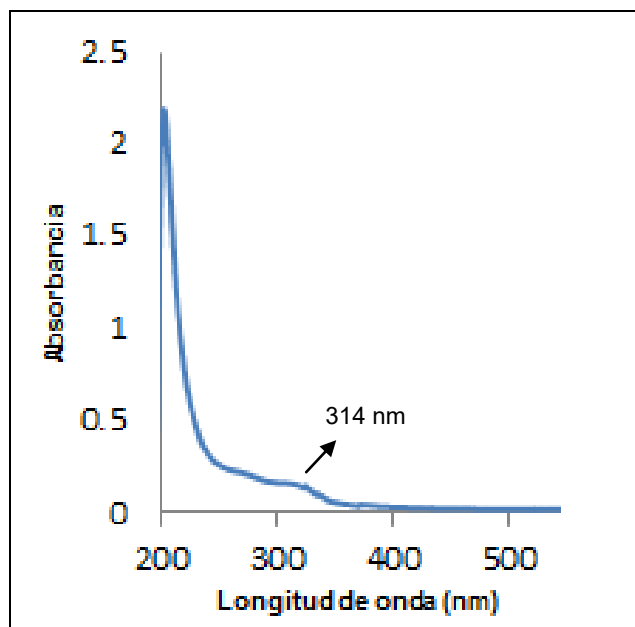


Figura 99. Espectro UV-Visible del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico Q-PAA10s en HCl 0,1 M.

En la Figura 99 se observa que el complejo interpolimérico Q-PAA10s presenta una absorbancia de muy baja intensidad a 314 nm.

7.8.4. UV-Visible de la isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, I/Q-PAA4s

Se realizaron los espectros UV-Visible del encapsulamiento I/Q-PAA4s en medio HCl 0,1 M.

7.8.4.1. Identificación de la isoniazida en el encapsulamiento I/Q-PAA4s

En la Figura 100 se observa el espectro UV-Visible del encapsulamiento I/Q-PAA4s. La máxima absorbancia del encapsulamiento I/Q-PAA4s es a 266,5 nm indicando que efectivamente la isoniazida ha sido encapsulada por el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico.

Por otro lado, los encapsulamientos I/Q-PAA1s e I/Q-PAA2s₂₀, no mostrados, presentan la misma absorbancia máxima (266,5 nm) que I/Q-PAA4s.

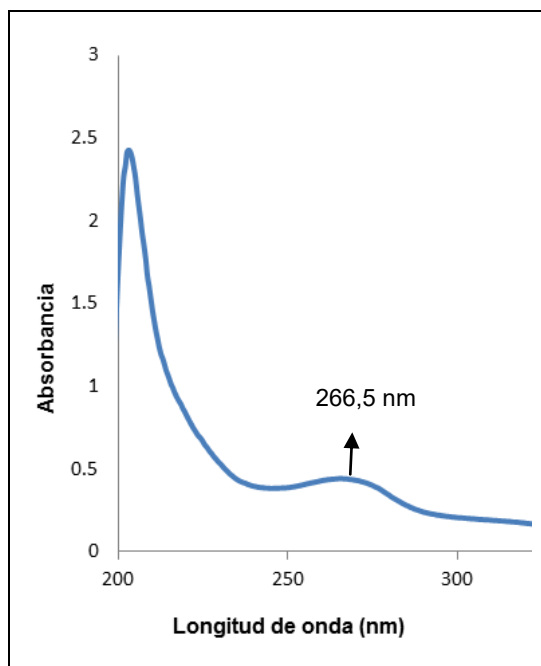


Figura 100. Espectro UV-Visible para la identificación de la isoniazida en el encapsulamiento I/Q-PAA4s (secado a 20 ° C)

7.8.4.2. Cuantificación de la isoniazida en el encapsulamiento I/Q-PAA4s

Eficiencia de carga y encapsulamiento

La determinación de la eficiencia de carga y de encapsulamiento de I/Q-PAA1s, I/Q-PAA2s₂₀ e I/Q-PAA4s (por duplicado), se logra a partir de la curva de calibración construida a partir de la concentración de isoniazida versus absorbancia (Figura 101).

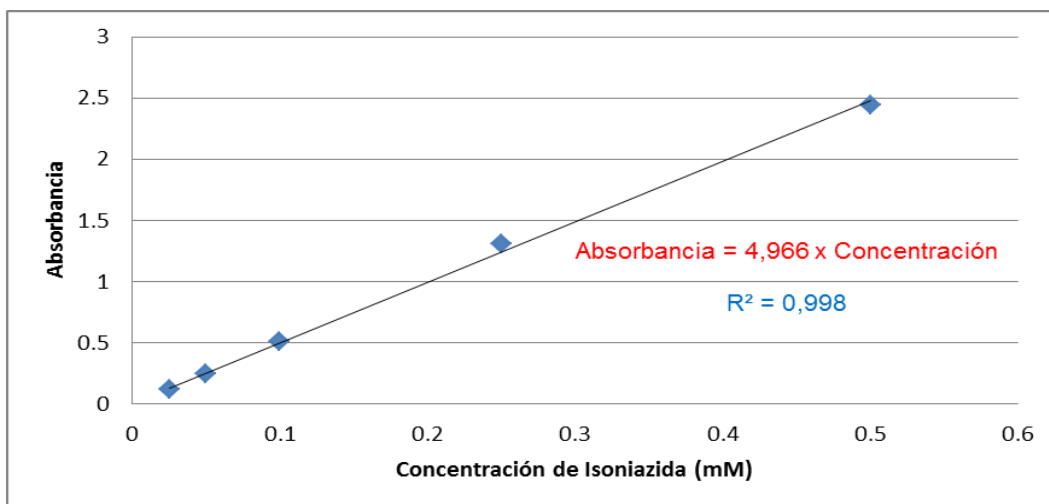


Figura 101. Curva de calibración de concentración de isoniazida (mM) en HCl 0,1 M versus absorbancia

En la Tabla 15 se observa las concentraciones de isoniazida en los encapsulamientos.

Tabla 15. Concentración de isoniazida en las muestras de encapsulamiento

Código de los encapsulamientos	Encapsulamiento Wisoniazida/Wqitosano (mg/mg)	% de Isoniazida en el encapsulamiento (Teórico)	Absorbancia	Concentración (mM)
I/Q-PAA1s	6 : 1	83,9	0,690	0,1389
I/Q-PAA2s ₂₀	1 : 1	46,6	0,918	0,1849
I/Q-PAA4s	0,5 : 1	30,9	0,583	0,1174
I/Q-PAA4s (duplicado)			0,639	0,1287

Asimismo, en la Tabla 16 se observa el porcentaje de eficiencia de carga y encapsulamiento de la isoniazida, las cuales se calculan de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$\text{Eficiencia de carga} = \frac{\text{Cantidad de droga encapsulada}}{\text{Peso del encapsulamiento}} \times 100 \% \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento} = \frac{\text{Cantidad de droga encapsulada}}{\text{Cantidad de droga total}} \times 100 \% \dots\dots\dots (2)$$

Tabla 16. Eficiencia de carga y encapsulamiento de la isoniazida en el encapsulamiento

Código de los encapsulamientos	Encapsulamiento Wisoniazida/ Wquitosano (mg/mg)	Peso de Isoniazida (mg) (Exp.)	Peso de Isoniazida (mg) (Teórica)	Eficiencia de carga (Teórico) %	Eficiencia de carga (Exp.) %	Eficiencia de encapsulamiento (Exp.) %
I/Q-PAA1s	6 : 1	0,1905	8,40	84	1,91	2,27
I/Q-PAA2s ₂₀	1 : 1	0,2604	4,66	46,6	2,60	5,59
I/Q-PAA4s	0,5 : 1	0,1610	3,04	30,4	1,61	5,30
I/Q-PAA4s (duplicado)		0,1765	3,04	30,4	1,77	5,81

Nota: Para la respectiva cuantificación, se considera 10 mg de muestra.

En la Tabla 16 se observa que el porcentaje de eficiencia de los encapsulamientos I/Q-PAA1s; I/Q-PAA2s₂₀ e I/Q-PAA4s es 2,27 ; 5,59 y 5,30 - 5,81 %, respectivamente. Lo cual indica que con la relación de isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 y 1 : 1 los porcentajes de eficiencia de encapsulamiento son muy similares, mientras que cuando la relación isoniazida/quitosano (mg/mg) es 6 : 1 el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento disminuye a 2,27 %. Por otro lado, la eficiencia de carga es mayor para la relación isoniazida/quitosano (mg/mg) 1 : 1 siendo este valor de 2,60 %, mientras que para las relaciones en peso de isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 y 6 : 1 son 1,61-1,77 % y 1,91 %, respectivamente, cuyos valores son cercanos.

Finalmente, el bajo porcentaje de eficiencia de carga y de encapsulamiento de I/Q-PAA1s; I/Q-PAA2s₂₀ e I/Q-PAA4s, como se observa en la Tabla 16 podría deberse a que la isoniazida tendría una baja afinidad al complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, solucionando este inconveniente al añadirle polietilenglicol, el cual presentan grupos OH los cuales interaccionarían con la parte polar de la isoniazida incrementando de esta manera la afinidad droga-polímero. Además, el polietilenglicol incrementaría la biocompatibilidad de este nuevo encapsulamiento con el organismo.¹⁴⁸ Por otro lado, el bajo porcentaje de eficiencia de carga y de

encapsulamiento podría deberse a que durante el lavado del encapsulamiento con agua se haya perdido, posiblemente, una cantidad considerable de droga debido a que esta tiene una gran afinidad a las moléculas de agua. Por ello, para evitar, la pérdida de isoniazida por lavado con agua, se podría obtener directamente las partículas del encapsulamiento en forma de aerosol mediante atomizadores (spray-dryer) que operan a bajas temperaturas²⁶ o de 110 °C a 140 °C como se encuentra reportado en la literatura para el encapsulamiento de isoniazida en el complejo interpolimérico Quitosano-Tripolifosfato.^{4,79} Además, para obtener partículas más pequeñas de las que se han obtenido en este trabajo (100 a 300 nm) se puede utilizar las sustancias lactosa, manitol, maltodextrina con o sin leucina las cuales evitarían el aglomeramiento de las partículas.⁴

8. CONCLUSIONES

1. Los espectros IR y RMN confirman la obtención de la polisuccinimida y del poliaspartato. Los cuales son obtenidos con un buen rendimiento, 97 y 62,3 %, respectivamente, y con un alto grado de pureza según lo reportado en la literatura.
2. La polisuccinimida posee un peso molecular de 18,2 kDa, determinado por viscosimetría capilar, el cual sometido a una hidrólisis básica produce poliaspartato de sodio de peso molecular 8,11 kDa determinado por SLS.
3. Las muestras de quitosano de alto peso molecular sometidas a hidrólisis con CH_3COOH 1 %, en un inicio a 73 °C y luego por varias semanas a temperatura ambiente, y por otro lado sometidas solamente a hidrólisis a temperatura ambiente producen quitosanos de menor peso molecular el cual fue determinado por GPC. Se obtienen los menores pesos moleculares cuando la muestra es sometida a hidrólisis en un inicio a 73 °C y luego por varias semanas a temperatura ambiente.
4. El grado de acetilación (GA) de la primera y segunda muestra de quitosano de alto peso molecular, determinado por $\text{RMN-}^1\text{H}$, es 4 – 5 % y 14 %, respectivamente.
5. Las soluciones coloidales del complejo interpolimérico se preparan al agregar la solución del poliaspartato sobre la solución del quitosano (agitación por una hora y a temperatura ambiente) con el objetivo de originar partículas en el rango nanométrico porque al añadir los reactivos en el orden inverso se originan partículas de mayor tamaño (aproximadamente 0,5 μm ; valor experimental determinado por DLS). Entonces, para la preparación de las soluciones coloidales del encapsulamiento, la isoniazida es disuelta en la solución del poliaspartato y ésta agregada sobre la solución del quitosano. La mejor relación de quitosano y poliaspartato (mg/mg) con la cual se logran partículas de menor tamaño del complejo interpolimérico es 6,94:1, mientras que para el encapsulamiento la mejor relación de isoniazida y quitosano (mg/mg) es 0,5:1. Asimismo, con la finalidad de lograr soluciones coloidales con partículas de menor tamaño, estas son ultracentrifugadas donde los sobrenadantes son considerados en el análisis DLS, TEM y AFM, además son secados para la caracterización (IR, SEM, STEM, DRX, ESI/MS, CCF y UV-Visible), siendo el proceso de secado en placas petri y no por liofilización porque con esta última técnica se produce partículas más compactas, las cuales dificultan el análisis espectrofotométrico. El secado en placas petri es a 20 °C para evitar la

descomposición de la isoniazida en ácido isonicotínico, la cual ocurre a gran velocidad cuando la droga está expuesta en medio ácido y calor.

6. El análisis TEM de la solución coloidal del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, Q-PAA10 (relación en peso quitosano/poliaspartato (mg/mg) 6,94 : 1), muestra el tamaño nano de las partículas, 60 a 209 nm. Asimismo, muestra la morfología casi esférica de las partículas, confirmado por el análisis AFM. Por otro lado, el análisis TEM de las partículas de isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico Q-PAA-10 con la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 muestra su tamaño de 25 a 134 nm con dos tipos de morfología, prácticamente esférica y alargada, confirmado por AFM.

7. El análisis DLS de la solución coloidal de isoniazida encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, Q-PAA10, con la relación en peso isoniazida/quitosano (mg/mg) 6 : 1; 1 : 1; 0,7 : 1 y 0,5 : 1 demuestra que con la relación 0,5 : 1 el tamaño de las partículas es $148,5 \pm 1$ nm, cuyo resultado no presenta mucha variación respecto al tamaño del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, Q-PAA10, el cual es $142,1 \pm 2,9$ nm.

8. Los resultados obtenidos por el análisis TEM de las soluciones coloidales del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico y del encapsulamiento demuestran que el tamaño de las partículas es menor que el encontrado por DLS debido a que el quitosano sufre de hinchamiento en medio acuoso.

9. Los análisis DRX e IR del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico, Q-PAA10s, y de la isoniazida encapsulada en dicho complejo interpolimérico, I/Q-PAA4s, demuestran que efectivamente se han formado ambos productos.

10. Los análisis de CCF y ESI/MS de la isoniazida, en medio ácido y a temperatura ambiente, demuestran que la isoniazida no se descompone en ácido isonicotínico en los tiempos: una hora (en HCl 0,1 M y CH₃COOH 1 %) y dos semanas (en CH₃COOH 1 %). Además, mediante el espectro ESI/MS del encapsulamiento se podría confirmar la encapsulación de la isoniazida al observarse el pico 138 m/z perteneciente al aducto $[M+H]^+$ de la isoniazida.

11. El análisis STEM del encapsulamiento resuspendido en etanol demuestra que el tamaño de las partículas se encuentra en el rango de 100 a 300 nm, mientras que el

análisis STEM del encapsulamiento resuspendido en agua demuestra que las partículas se aglomeran formando una masa compacta donde el tamaño de las partículas se encuentra en el rango de micras.

12. La comparación de las imágenes SEM del complejo interpolimérico y del encapsulamiento demuestra que ambos poseen una morfología diferente. El complejo interpolimérico presenta una morfología de granos con superficie rugosa y láminas corrugadas con superficie lisa, mientras que, el encapsulamiento posee una morfología de granos con una región rica de filamentos largos, posiblemente, por la presencia de la isoniazida.

13. El análisis SEM demuestra que el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado posee una morfología más compacta y dura que el complejo interpolimérico secado a 40 °C en placas petri debido a que durante la liofilización las partículas se aglomeran en mayor grado.

14. El análisis UV-Visible demuestra que efectivamente la isoniazida se encuentra encapsulada en el complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico. Siendo el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento mayor para las relaciones isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 y 1 : 1 (5,30 - 5,81 y 5,59 %, respectivamente), mientras que cuando la relación isoniazida/quitosano (mg/mg) es 6 : 1 el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento es 2,27 %. Por otro lado, el porcentaje de eficiencia de carga es mayor para la relación isoniazida/quitosano (mg/mg) 1 : 1 siendo este valor de 2,60 %, mientras que para las relaciones en peso de isoniazida/quitosano (mg/mg) 0,5 : 1 y 6 : 1 son 1,61-1,77 % y 1,91 %, respectivamente.

9. RECOMENDACIONES

1. Se propone para una futura investigación sintetizar un nuevo encapsulamiento de isoniazida en el polímero quitosano-poli(etilenglicol)-poli(ácido aspártico), aún no estudiado, con el fin de incrementar el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento y carga por la afinidad que presentan los grupos OH del poli(etilenglicol) con la parte polar de la isoniazida. Asimismo, el poli(etilenglicol) incrementaría la biocompatibilidad del nuevo encapsulamiento con el organismo.
2. Se propone que el nuevo encapsulamiento sea obtenido en forma de partículas aerosol mediante el atomizador (spray-dryer) que opera a bajas temperaturas o de 110 a 140 °C utilizando las sustancias lactosa, manitol, maltodextrina con o sin leucina las cuales evitarían el aglomeramiento de las partículas.
3. La síntesis de la polisuccinimida podría realizarse por un método diferente al reportado en este trabajo, con la finalidad de obtener polisuccinimidas de bajo peso molecular y de esta manera por hidrólisis básica obtener un poliaspartato de peso molecular menor a 8,11 kDa, determinado en este trabajo, con el objetivo de obtener partículas mucho más pequeñas de complejo interpolimérico y encapsulamiento. De acuerdo a la literatura, se podría emplear los métodos de condensación térmica de anhídrido maleico y amonio y/o la condensación térmica del monómero DL-ácido aspártico o L-ácido aspártico sin catalizador (H_3PO_4).
4. Finalmente, se propone un nuevo encapsulamiento de isoniazida en el polímero quitosano-poli(etilenglicol)-poli(ácido glutámico), aún no estudiado. El poli(ácido glutámico), es un polímero aniónico no tóxico y biocompatible, estructuralmente muy similar al poli(ácido aspártico), solo se diferencia en que este último polímero posee un CH_2 menos que el poli(ácido glutámico).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Kirikae, T.; Andou, H.; Suetake, T.; Nakamura, T. Method for Detecting Sensitivity to Isoniazid in M. tuberculosis. European Patent : EP 2 322 659 B1, **2009**.
2. Ranjita, Sh.; Loaye, Al; Khalil, M. Present Status of Nanoparticles Research for Treatment of Tuberculosis. J Pharm Pharmaceut Sci **2011**, 14, 100-116.
3. Zhang, L.; Gu, FX.; Chan, JM.; Wang, AZ.; Langer, RS.; Farokhzad, OC. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. Clinical Pharmacology & Therapeutics **2008**, 83, 761-769.
4. Pourshahab, P.; Gilani, K.; Moazeni, E.; Eslahi, H.; Fazeli, M.; Jamalifar, H. Preparation and Characterization of Spray Dried Inhalable Powders Containing Chitosan Nanoparticles for Pulmonary Delivery of Isoniazid. Journal of Microencapsulation **2011**, 28, 605-613.
5. Zumla, A.; Raviglione, M.; Hafner, R.; Fordham, C.; Reyn M. Tuberculosis. The New England Journal of Medicine **2013**, 368, 745 – 755.
6. World Health Organization, Global Tuberculosis Report 2014 file:///C:/Documents%20and%20Settings/santy/Escritorio/TBC%20WHO.pdf, (*Accesado Febrero 2014*).
7. http://www.minsa.gob.pe/portada/esntbc_inf_estadistica.asp (*Accesado Enero 2014*)
8. Hari, B.N.; Chitra, K.; Shimavarapu, R.; Karunakaran, P.; Muthukrishnan, N.; Rani, B. Novel technologies: A weapon against tuberculosis. Indian Journal of Pharmacology **2010**, 42, 338-344.
9. <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-06152011-092059/unrestricted/01chapter1.pdf> (*Accesado Marzo 2014*)

10. Kolyva, A.; Karakousis, P. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance, *Johns Hopkins University Center for Tuberculosis Research* <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/28840> (*Accesado Enero 2014*)

11. <http://immunopaedia.org.za/fileadmin/gallery/TB%20Drugs%20-20First%20Line/isoniazid.jpg> (*Accesado Enero 2014*)

12. Global Alliance for TB Drug Development, Handbook of anti-tuberculosis agents, *Tuberculosis* **2008**, 88, 112-116.

13. <http://www.unavarra.es/genmic/docbiomica/mycotranscriptomica.pdf> (*Accesado Enero 2014*)

14. Amin, A.; Goude, R.; Shi, L.; Zhang, J.; Chatterjee, D.; Parish, T. EmbA is an Essential Arabinosyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **2008**, 154, 240–248.

15. Kumar, M.; Kumar, N.; Domb, A.; Arora, M. Pharmaceutical Polymeric Controlled Drug Delivery Systems. *Advances in Polymer Science* **2002**, 160, 45 – x

16. Brannon-Peppas, L. Polymers in controlled Drug Delivery. *Medical plastics and Biopolymers materials* **1997**, <http://www.mddionline.com/article/polymers-controlled-drug-delivery> (*Accesado Enero 2014*)

17. Gelperina, S.; Kisich, K.; Iseman, M.; Heifets, L. The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2005**, 172, 1487-1490.

18. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, 75, 1-18.

19. Mulla, S.; Phale, P.; Saraf, M. Use of X-Ray Diffraction Technique for Polymer Characterization and Studying the Effect of Optical Accessories. *AdMet* **2012**, OM 006, 1-6.

20. Duncan, R. The Dawning Era of Polymer Therapeutics. *Drug Discovery* **2003**, 2, 347-360.
21. Ahmad, Z.; Rajesh, P.; Sharma, S.; Khuller, G.K. Alginate Nanoparticles as Antituberculosis Drug Carriers: Formulation Development, Pharmacokinetics and Therapeutic Potential. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences* **2006**, 48, 171 – 176.
22. Pandey, R.; Zahoor, A.; Sharma, S.; Khuller, G.K. Nanoparticle Encapsulated Antitubercular Drugs as a Potential Oral Drugs Delivery System Against Murine Tuberculosis. *Tuberculosis* **2003**, 83, 373-378.
23. Silva, M.; Lara, A.S.; Leite, C.; Ferreira, E. Potential Tuberculostatic Agents: Micelle-Forming Copolymer Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Prodrug with Isoniazid. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, 334, 189-193.
24. Gajendiran, M.; Gopi, V.; Elangovan, V.; Murali, R.; Balasubramanian, S. Isoniazid Loaded Core Shell Nanoparticles Derived from PLGA–PEG–PLGA Tri-block Copolymers: In Vitro and In Vivo Drug Release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 104, 107-115.
25. Veerapandian, M.; Marimuthu, M.; Yun, K-S.; Kim, S. Biomaterial as Nanobiopharmaceuticals. *The J. Pharm. Sci.* **2009**, 33, 1-21.
26. Bharti, N.; Kumar, S.L.; Budhiraja, A. Pulmonary Drug Delivery as a Vital Route for Delivering Nanoparticles – a Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2013**, 2, 4037-4060.
27. Krishna Sailaja, A.; Amareshwar, P.; Chakravarty, P. Different Techniques Used for the Preparation of Nanoparticles Using Natural Polymers and their Application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, 3, 45-50.

28. Lee, W-K.; Park, J-Y.; Junga, S.; Yang, Ch.; Kim, W-U.; Kim, H-Y.; Park, J-H.; Park, J-S. Preparation and Characterization of Biodegradable Nanoparticles Entrapping Immunodominant Peptide Conjugated with PEG for Oral Tolerance Induction. *Journal of Controlled Release* **2005**, *105*, 77–88.
29. Hajdu, I.; Bodnár, M.; Filipcsei, G.; Hartmann, J.; Daróczy, L.; Zrínyi, M.; Borbély, J. Nanoparticles Prepared by Self-Assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic acid. *Colloid & Polymer Science* **2008**, *286*, 343-350.
30. Fox, M.; Szoka, F.; Fréchet, J. Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 1141 – 1151.
31. Park, J.; Saravanakumar, G.; Kim, K.; Kwon, I. Targeted Delivery of Low Molecular Drugs Using Chitosan and its Derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 28-41.
32. <http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/PDF/SLS-protocol.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
33. <http://www.chem.iitkgp.ernet.in/faculty/SDG/Scattering%20by%20macromoleculesII.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
34. http://www.nottingham.ac.uk/ncmh/harding_pdfs/Paper208.PDF (*Accesado Marzo 2014*).
35. Odian G. Principles of Polymerization; Willey-Interscience, 4 th Edición, New York, **2004**, pp 22.
36. Zegarra Urquia, Carmen Luz. Síntesis de un nuevo vehículo polimérico α,β -poli(DL-ácido aspártico) del agente antidiabético oxovanadio(IV). Tesis Magister, Pontificia Universidad Católica del Perú, **2012**.
37. <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=9758#2> (*Accesado Marzo 2014*).

38. Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Multiangle Light Scattering (MALS) detection: principles and application to the study of cellulose <http://dare.uva.nl/document/68926> (*Accesado Marzo 2014*).
39. <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-7196EN.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
40. <file:///C:/Documents%20and%20Settings/user/Mis%20documentos/Downloads/COLUNA%20TSK%20GEL%20G5000PW.pdf> (*Accesado Enero 2015*).
41. <http://whale.wheelock.edu/bwcontaminants/analysis.html> (*Accesado Marzo 2014*).
42. <http://www.mtpgroup.nl/amm-laboratory-course.aspx> (*Accesado Marzo 2014*).
43. Wang, Y.; Hou, Y.; Ruan, G.; Pan, M.; Liu, T. Study on the Polymerization of Aspartic Acid Catalyzed by Phosphoric Acid. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **2003**, *40*, 293 - 307.
44. <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/> (*Accesado Marzo 2014*).
45. <http://faa.unse.edu.ar/apuntes/analinst/temsem.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
46. <http://cbe.ivic.ve/mic250/pdf/thesebook-chap3.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
47. <http://micron.ucr.edu/public/manuals/Tem-intro.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).
48. <http://apocketmerlin.tumblr.com/post/14864414040/analysis-of-cell-components-magnification> (*Accesado Marzo 2014*).
49. <http://www.purdue.edu/rem/rs/sem.htm> (*Accesado Marzo 2014*).
50. <http://www.texample.net/tikz/examples/scanning-electron-microscopy/> (*Accesado Marzo 2014*).

51. Swapp S., Scanning Electron Microscopy (SEM)
http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html
(Accesado Marzo **2014**).
52. http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/practicas-2/Practicas_de_SEM.pdf
(Accesado Enero **2015**).
53. http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/bmfcib817c/doc/capitulos/capitulo_4.pdf
(Accesado Enero **2015**).
54. Atomic Force Microscopy : A guide to understanding and Using the AFM, Galloway Group Spring **2004**.
55. Wilson R., Bullen H., Introduction to Scanning Probe Microscopy (SPM)
http://asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule_BasicTheoryAFM.pdf
(Accesado Marzo **2014**).
56. Atomic Force Microscopy: General Concept and Defining Characteristics
http://www.nrl.navy.mil/chemistry/6170/6177/afm_concept.php (Accesado Marzo **2014**).
57. http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture_10_AFM.pdf (Accesado Marzo **2014**).
58. Shaw R., Malvern www.atascientific.com.au (Accesado Marzo **2014**).
59. Malvern, Dynamic Light Scattering, 2011, www.malvern.com (Accesado Marzo **2014**).
60. <http://www.dkfz.de/Macromol/research/dls.html> (Accesado Marzo **2014**).
61. Jung J., New Development of β -Chitosan from Jumbo Squid Pens (*Dosidicus gigas*) and its Structural, Physicochemical, and Biological Properties, Thesis Doctoral Program, Oregon State University, **2013**.

62. Sun Y., Investigating static and dynamic light scattering 2011
<http://arxiv.org/pdf/1110.1703.pdf> (*Accesado Marzo 2014*).

63. Arzenšek D., Dynamic light scattering and application to proteins in solutions, **2010**.
http://www-f1.ijs.si/~rudi/sola/Dynamic_light_scattering_and_application_to_proteins_in_solutions.pdf
(Accesado Marzo 2014).

64. http://www.polymertechnology.it/bacheca/NanocompositeForm/page5/files/rx_2.pdf
(Accesado Marzo 2014).

65. Banerjee, Sh.; Mazumdar, Sh. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. International Journal of Analytical Chemistry **2012**, 2, 1-40.

66. <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/introduction> (*Accesado Octubre 2014*)

67. Poole Colin F. The essence of chromatography; Elsevier Science B.V., 1th Edición **2004**, pp 22.

68. Silva, M.; Ferreira, E.; Leite, C.; Sato, D. Preparation of Polymeric Micelles for Use as Carriers of Tuberculostatic Drugs. Tropical Journal of Pharmaceutical Research **2007**, 6, 815-824.

69. Semete, B.; Kalombo, L.; Chelule, P.; Benadie, Y.; Booysen, L.; Katata, L.; Naidoo, S.; Swai, H. Novel Nanoparticles for Tuberculosis Chemotherapy, Material Science and Manufacturing. Polymers and Bioceramics, Pretoria, pp 1-9.
http://researchspace.csir.co.za/dspace/bitstream/10204/2532/1/Semete_2008.pdf
(Accesado Octubre 2014)

70. Pandey, R.; Sharma, S.; Khuller, G.K. Oral Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticle Based Antituberculosis Drug Delivery: Toxicological and Chemotherapeutic Implications. Indian Journal of Experimental Biology **2006**, 44, 459-467.

71. Pandey, R.; Khuller, G.K. Oral Nanoparticles-Based Antituberculosis Drug Delivery to the Brain in an Experimental Model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *57*, 1146-1152.
72. Sharma, A.; Sharma, S.; Khuller, G.K. Lectin-Functionalized Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles as Oral/Aerosolized Antitubercular Drug Carriers for Treatment of Tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2004**, *54*, 761-766.
73. Singh, A.; Jain, R. Novel Pharmaceutical Compositions of Anti-tubercular Drugs and Process for their Preparation. Patent US 2003/0072800 A1, April 17, **2003**.
74. Bhatt, D.; Trivedi, R.; Modi, A.; Khamar, M. Pharmaceutical composition of isoniazid. Patent WO 2011/012987 A1, Feb., **2011**.
75. Akansha, T.; Ranjana, G.; Shubhini, S. PLGA Nanoparticles of Anti Tubercular Drug : Drug Loading and Release Studies of a Water In-soluble Drug. *International Journal of PharmTech Research* **2010**, *2*, 2116-2123.
76. Sabitha, P.; Ratna, J.; Reddy, K. Design and Evaluation of Controlled Release Chitosan-Calcium Alginate Microcapsules of Anti Tubercular Drugs for Oral Use. *International Journal of ChemTech Research* **2010**, *2*, 88-98.
77. Rawat, J.; Jain, P.; Ravichandran, V.; Agrawal, R.K. Synthesis and Evaluation of Mutual Prodrugs of Isoniazid, *p*-amino salicylic acid and ethambutol. *ARKIVOK* **2007**, (*i*), 105-118.
78. Ahmad, Z.; Nanomedicine for Tuberculosis: Insights from Animal Models. *International Journal of Nano Dimension* **2011**, *2*, 67-84.
79. Kundawala, A.; Patel, V.; Patel, H.; Choudhary, D. Isoniazid Loaded Chitosan Microspheres for Pulmonary Delivery: Preparation and Characterization. *Der Pharamacia Sinica* **2011**, *2*, 88-97.
80. Majeti, N. V.; Ravi, K. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *J Pharm Pharmaceut Sci* **2000**, *3*, 234-258.

81. Riva, R.; Ragelle, H.; Rieux, A.; Duhem, N.; Jérôme, C.; Préat, V. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Adv Polym Sci* **2011**, *244*, 19-44.
82. Jeremy, L.; Chen, J.L. Investigation of Film Forming Properties of β -chitosan from Jumbo Squid Pens (*Dosidicus gigas*) and Improvement of Water Solubility of β -chitosan. Thesis Master of Science, Oregon State University, **2012**.
83. Johnson, E. Compositions of Alpha-and Beta-chitosan and Methods of Preparing them, US 2005/0203058 A1, Sep. 15, **2005**.
84. De Moura, J.; Lucas, J-M.; Trombotto, S.; David, L.; Campana-Filho, S. Effects of the Biomass Nature and Grinding on the Characteristics of Chitin. *Advances in Chitin Sciences EUCHIS'11*, Vol. XIII, 54-58.
85. Zheng, Y.; Yang, W.; Wang, Ch.; Hu, J.; Fu, Sh.; Dong, L.; Wu, L.; Shen, X. Nanoparticles Based on the Complex of Chitosan and Polyaspartic acid Sodium Salt: Preparation, Characterization and the Use for 5-Fluorouracil Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *67*, 621-631.
86. Gavhane, N.; Gurav, A.; Yadav, A. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2013**, *4*, 312-331.
87. Kumirska, J.; Weinhold, M; Czerwicka, M; Kaczynski, Z.; Bychowska, A.; Krzysztof, B.; Thöming, J.; Stepnowski, P. Influence of the chemical structure and physicochemical properties of chitin- and chitosan-based materials on their biomedical activity biomedical engineering. *Trends in Materials Science*, 25-64, www.intechopen.com. (Accesado Marzo **2014**).
88. Neuse, E. Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine. *Metal-Based Drugs* **2007**, *2008*, 1-19.

89. Yokoyama, M.; Znoue, S.; Kataoka, K.; Yui, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. Molecular Design for Missile Drug : Synthesis of Adriamycin Conjugated with Immunoglobulin G using Poly(ethyleneglycol)-block-Poly(aspartic acid) as Intermediate Carrier. *Makromolekulare Chemie* **1989**, *190*, 2041-2054.
90. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, Sh. Characterization and Anticancer Activity of the Micelle-forming Polymeric Anticancer Drug Adriamycin-Conjugated Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Block Copolymer. *CANCER RESEARCH* **1990**, *50*, 1693-1700.
91. Wang, CH.; Wang, WT.; Hsiue, GH. Development of Polyion Complex Micelles for Encapsulating and Delivering Amphotericin B. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3352 - 3358.
92. Gyenes, T.; Torma, V.; Zrínyi, M. Swelling Properties of Aspartic Acid-Based Hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *319*, 154 – 158.
93. Ross, R. Soluble, Crosslinked Polyaspartates. U.S. Patent 5,552,516, Sep. 3, **1996**.
94. Neri, P.; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide. *Macromolecular Syntheses* **1982**, *8*, 25 - 28.
95. Neri, P.; Antoni, G. Alpha, Beta-Poly(2-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide, A New Plasma Expander. *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, *16*, 893-897.
96. Shinoda, H.; Asou, Y.; Suetsugu, A.; Tanaka, K. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Biodegradable Copolymer, Poly(aspartic acid-co-lactic acid). *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 34-43.
97. Zamani, A.; Taherzadeh, M. Production of Low Molecular Weight Chitosan by Hot Dilute Sulfuric Acid. *BioResources* **2010**, *5*, 1554-1564.

98. Palpandi, H.; Shanmugam, V.; Shanmugam, A. Extraction of Chitin and Chitosan from Shell and Operculum of Mangrove Gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* **2009**, *1*, 198-205.

99. Leceta, I.; Guerrero, P.; De la Caba, K. Functional Properties of Chitosan-Based Films. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *93*, 339-346.

100. Bustos, K.; Martínez, A.; Martínez, G.; De Icaza, M.; Castaño, V.; Velasco, C. Covalently Bonded Chitosan on Graphene Oxide Via Redox Reaction. *Materials* **2013**, *6*, 911-926.

101. Islam, M.; Masum, Sh.; Mahbubur, M.; Molla, M.; Shaikh, A.; Roy, S.K. Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of its Properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS* **2011**, *11*, 77 – 80.

102. Mourya, V.; Inamdar, N. Trimethyl Chitosan and its Applications in Drug Delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, *20*, 1057-1079.

103. Ramya, R.; Sudha, P.; Mahalakshmi, D. Preparation and Characterization of Chitosan Binary Blend. *International Journal of Scientific and Research Publications* **2012**, *2*, 1-9.

104. Sewvandi, G.; Adikary, S. Synthesizing and Characterization of Natural Biopolymer Chitosan Derived from Shrimp Type, *Penaeus monodon*. *Tropical Agricultural Research* **2012**, *23*, 272-276.

105. Darras, V.; Nelea, M.; Winnik, F.; Buschmann, M. Chitosan Modified with Gadolinium Diethylenetriaminepentaacetic Acid for Magnetic Resonance Imaging of DNA/Chitosan Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80*, 1137-1146.

106. Amaral, I.; Granja, P.; Barbosa, M. Chemical Modification of Chitosan by Phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM Study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2005**, *16*, 1575 – 1593.

107. López-Pérez, P.; Marques, A.; Da Silva, R.; Pashkuleva, I.; Reis, R. Effect of Chitosan Membrane Surface Modification Via Plasma Induced Polymerization on the Adhesion of Osteoblast-like Cells. *Journal of Materials Chemistry* **2007**, *17*, 4064-4071.
108. Liao J-D.; Lin, Sh-P.; Wu, Y-T. Dual Properties of the Deacetylated Sites in Chitosan for Molecular Immobilization and Biofunctional Effects. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 392-399.
109. Kumar, P.; Choonara, Y.; Du Toit, L.; Modi, G.; Naidoo, D.; Pillay, V. Novel High-Viscosity Polyacrylamidated Chitosan for Neural Tissue Engineering: Fabrication of Anisotropic Neurodurable Scaffold Via Molecular Disposition of Persulfate-Mediated. Polymer Slicing and Complexation **2012**, *13*, 13966-13984.
110. George, T.; Guru, K.; Vasanthi, N.; Kannan, K. Extraction, Purification and Characterization of Chitosan from Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Science and Technology* **2011**, *1*, 43-48.
111. Kim, K.; Son, J.; Kim, S-K.; Weller, C.; Hanna, M. Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type. *Journal of Food Science E : Food Engineering and Physical Properties* **2006**, *71*, 119-124.
112. Silverstein, R.; Webster F. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., 6^{ta} Edición, New York, **1997**, 71-143.
113. Dinga, W.; Lianb, Q.; Samuelsb, R.; Polka, M. Synthesis and Characterization of a Novel Derivative of Chitosan. *Polymer* **2003**, *44*, 547-556.
114. Le Tien, C.; Lacroix, M.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M-A. N-acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93*, 1-13.
115. Lavertu, M.; Darras, V.; Buschmann, M. Kinetics and Efficiency of Chitosan Reacetylation. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1192-1198.

116. Brooker, A. D.; Brooker, A. T.; Combs, K.; Muller, L.; Godfrey, S.; Mallender, P. Acetylation of chitosan, U.S. Patent, US 2009/0197789 A1, Aug. 6, **2009**.
117. Wu, Y.; Zheng, Y.; Yang, W.; Wang, Ch.; Hu, J.; Fu, Sh. Synthesis and Characterization of a Novel Amphiphilic Chitosan-Polylactide Graft Copolymer. *Carbohydrate Polymers* **2005**, *59*, 165-171.
118. Kim, S.; Min, S.; Kim, J-H. Synthesis and Characterization of Novel Amino Acid-co-Poly(aspartic acid) Derivatives. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2008**, *29*, 1887-1892.
119. Vu Bach, Q.; Moon, JR.; Lee, DS.; Kim, J-H. Lower Critical Solution Temperature Behavior of Amphiphilic Copolymers Based on Polyaspartamide Derivatives. *Journal of Applied Polymer Science* **2008**, *107*, 509-513.
120. Nită, L.; Chiriac, A.; Popescu, C.; Neamtu, I.; Alecu L. Possibilities for Poly(aspartic acid) Preparation as Biodegradable Compound. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2006**, *8*, 663 - 666.
121. Yang, J.; Fang, L.; Tan, T. Synthesis and Characterization of Superabsorbent Hydrogels Composites Based on Polysuccinimide. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, *102*, 550-557.
122. Steven, C. Copolymers of Amino Acids and Methods of Their Production, U.S. Patent 6,825,313 B2, Nov. 30, **2004**.
123. Tudorachi, N.; Chiriac, A. TGA/FTI R/MS Study on Thermal Decomposition of Poly(succinimide) and Sodium poly(aspartate). *Polymer Testing* **2011**, *30*, 397-407.
124. Wolk, S.; Swift, G.; Paik, Y.; Yocom, K.; Smith, R.; Simon, E. One-and Two-Dimensional Nuclear Resonance Characterization of Poly(aspartic acid) Prepared by Thermal Polymerization of L-aspartic acid. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7613-7620.
125. Vlasák, J.; Rypáček, F.; Drobnik, J.; Saudek, V. Properties and Reactivity of Polysuccinimide. *Journal of Polymer Science* **1979**, *66*, 59-64.

126. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, File N^o : NA/932, Australia, May **2001**.
127. Sumayya, A.; Panicker, C.; Varghese, H.; Harikumar, B. Vibrational Spectroscopic Studies and AB Initio Calculations of L-Glutamic Acid 5-Amide. *Rasayan Journal of Chemistry* **2008**, *1*, 548 - 555.
128. Sikes, T.; Sikes, C.; Hochwalt, M. Amino Acid, Carbohydrate and Acrylamide Polymers Useful as Flocculants in Agricultural and Industrial Settings. U.S. Patent 20090127205, May 5, **2009**.
129. Ho, G-H.; Ho, T-I.; Hsieh, K-H.; Y-Ch.; Lin, P-Y.; Yang, J.; Yang, K-H.; Yang, S-Ch. γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus Subtilis* (natto) : Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2006**, *53*, 1363-1384.
130. Sun, B.; Mi, Z-T.; An, G.; Liu, G.; Zou, J-J. Preparation of Biomimetic Materials Made from Polyaspartyl Polymer and Chitosan for Heavy-Metal Removal. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48*, 9823-9829.
131. Mrvčič, J.; Stanzer, D.; Grba, S. The Influence of Different Factors on Manganese Incorporation into *Saccharomyces cerevisiae*. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **2009**, *74*, 327-332.
132. Tomida, M.; Nakato, T.; Matsunami, Sh.; Kakuchi, T. Convenient Synthesis of High Molecular Weight Poly(succinimide) by Acid-Catalysed Polycondensation of L-Aspartic Acid. *Polymer* **1997**, *38*, 4733-4736.
133. Joentgen, W.; Müller, N.; Mitschker, A.; Schmidt, H. Polyaspartic acids, In *Biopolymers-Polyamides and Complex Proteinaceous Materials I*, S.R. Fahnenstock, and A. Streinbüchel, eds. (Weinheim : Wiley. VCH), **2003**, *7*, 175-199.
134. Argin-Soysal, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. Effect of Complexation Conditions on Xanthan–Chitosan Polyelectrolyte Complex Gels. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 202 – 209.

135. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, File N^o : NA / 932, Australia, Mayo **2001**.
136. Kaya, M.; Tozak, K.; Baran, T.; Sezen, G.; Sargin, İ. Natural Porous and Nano Fiber Chitin Structure from *Gammarus Argaeus* (Gammaridae Crustacea). EXCLI Journal **2013**, *12*, 503-510.
137. Sewvandi, G.; Adikary, S. Synthesizing and Characterization of Natural Biopolymer Chitosan Derived from Shrimp Type, *Penaeus monodon*. Tropical Agricultural Research **2012**, *23*, 272-276.
138. Bhutani, H.; Singh, S.; Vir, S.; Bhutani, K.; Kumarc, R.; Chakraborti, A.; Jindal, K. LC and LC-MS Study of Stress Decomposition Behaviour of Isoniazid and Establishment of Validated Stability-Indicating Assay Method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **2007**, *43*, 1213-1220.
139. Yu-Jen Chen. The Solubility Enhancement and the Stability Assessment of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide in Aqueous Media. Thesis Master Program, Rhodes University, **2000**.
140. Borba, A.; Gómez-Zavaglia, A.; Fausto, R. Molecular Structure, Infrared Spectra, and Photochemistry of Isoniazid Under Cryogenic Conditions. The Journal of Physical Chemistry A **2009**, *113*, 9220-9230.
141. Hashiguchi, M.; Ohno, K.; Sakuma, A.; Hino, F.; Tanaka, T.; Ohtsuji, M.; Matsumoto, N.; Yanase, K.; Urae, A.; Hosogai, Y.; Sato, N.; Yasaki, A.; Matsuda, K.; Yamazaki, K.; Rikihisa, T. A Simplified Method for Detecting Isoniazid Compliance in Patients Receiving Antituberculosis Chemotherapy. Journal Clinical Pharmacology **2002**, *42*, 151-156.
142. Poole, N.; Meyer, A. Stability of Isoniazid in Aqueous Solutions and Plasma. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **1960**, *104*, 560-562.

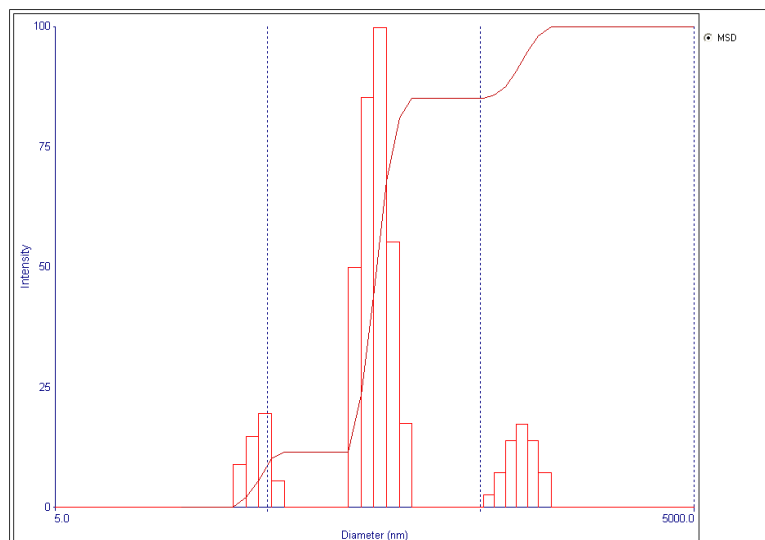
143. Yalgudre, R.; Gokavi, G. Mechanism of Oxidation of the Antituberculosis Drug Isoniazid by Bromate in Aqueous Hydrochloric Acid Medium. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2012**, *51*, 5135-5140.
144. Pawar, P.; Lagad, A.; Bahir, S.; Rathi, S. Simultaneous UV Spectrophotometric Method for Estimation of Isoniazid and Pyridoxine in Tablet Dosage Form. *Der Pharma Chemica* **2012**, *4*, 749-754.
145. Córdoba-Díaz, D.; Córdoba-Díaz, M.; Elorza, B. Quantification of Isonicotinoyl Lactosyl Hydrazone in Oral Pharmaceutical Dosage Forms. *Spectroscopy* **2009**, *23*, 201-208.
146. Henning, L. Reduction of Isonicotinic Acid in Acid Solution. *Acta Chemica Scandinavica* **1963**, *17*, 972-973.
147. Drmanić, S.; Nikolić, J.; Marinković, A.; Šekularac, G.; Jovanović, B. The Effects of Solvents and Structure on the Electronic Absorption Spectra of the Isomeric Pyridine Carboxylic Acid *N*-oxides. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* **2013**, *19*, 385-388.
148. Harris, J.; Dust, J.; McGill, R.; Harris, P.; Edgell, M.; Sedaghat-Herati, R.; Karr, L.; Donnelly, D. New Polyethylene Glycols for Biomedical Applications, ACS Symposium 467, American Chemical Society, Washington, D.C. **1991**, 418 – 429.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico

Q-PAA2

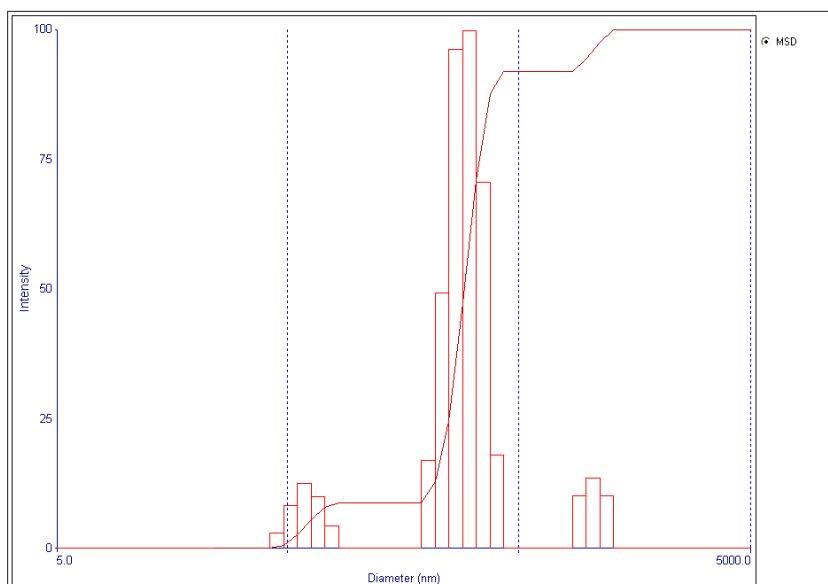
CZI-46-5 (Combined)
Feb 26, 2013 07:37:13
Effective Diameter: 145.1 nm
Polydispersity: 0.253
Avg. Count Rate: 265.7 kcps
Baseline Index: 4.2
Elapsed Time: 00:01:30



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	140.5	70.0	0.249	0.0
2	149.5	75.6	0.257	9.2
Mean	145.0	72.9	0.253	4.6
Std. Error	4.5	2.9	0.005	4.5
Combined	145.1	73.0	0.253	4.2

Q-PAA3

CZI-46-2 (Combined)
Feb 26, 2013 08:14:36
Effective Diameter: 247.2 nm
Polydispersity: 0.239
Avg. Count Rate: 471.8 kcps
Baseline Index: 0.0
Elapsed Time: 00:01:30

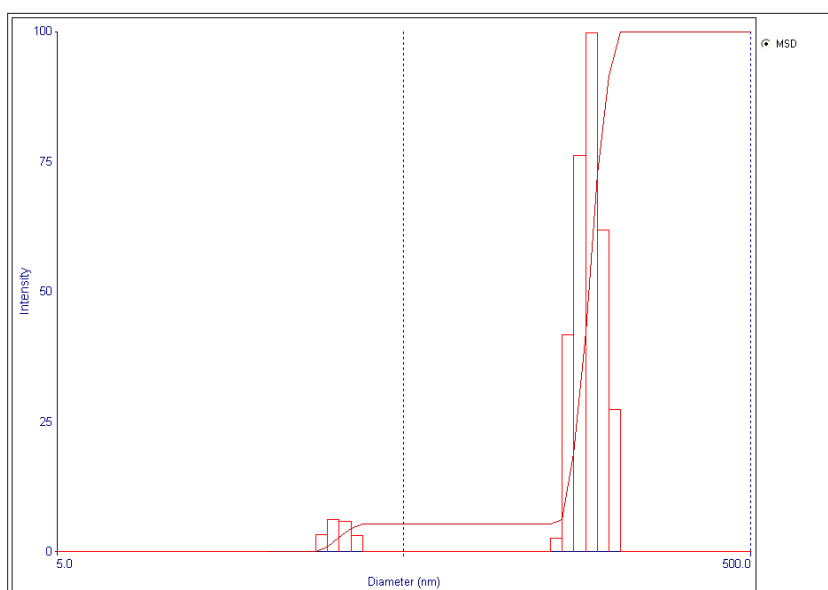


Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	237.0	117.7	0.245	3.2
2	254.3	125.4	0.243	0.0
Mean	245.6	121.5	0.245	1.6
Std. Error	8.6	3.9	0.002	1.6
Combined	247.2	120.7	0.239	0.0

Q-PAA4

CZI-46-2 (Combined)
Feb 26, 2013 07:42:57

Effective Diameter: **147.4 nm**
Polydispersity: **0.153**
Avg. Count Rate: **373.8 kcps**
Baseline Index: **0.0**
Elapsed Time: **00:01:30**

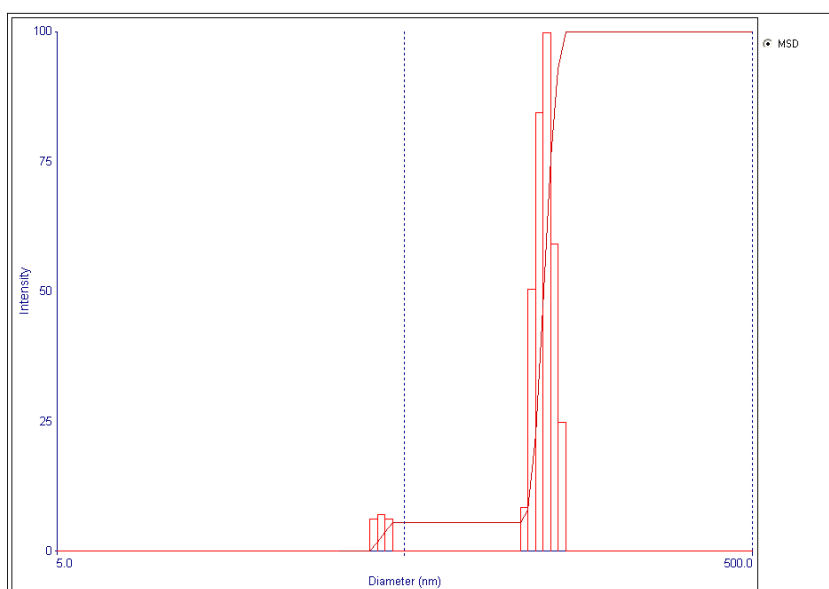


Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	146.3	54.1	0.137	0.0
2	148.9	61.8	0.172	0.0
Mean	147.6	57.9	0.154	0.0
Std. Error	1.3	3.8	0.018	0.0
Combined	147.4	57.7	0.153	0.0

Q-PAA5

10 (Combined)
Feb 26, 2013 07:27:53

Effective Diameter: **114.0 nm**
Polydispersity: **0.080**
Avg. Count Rate: **389.5 kcps**
Baseline Index: **8.6**
Elapsed Time: **00:01:30**



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	113.3	27.7	0.060	8.2
2	114.9	39.7	0.119	9.6
Mean	114.1	33.7	0.090	8.9
Std. Error	0.8	6.0	0.030	0.7
Combined	114.0	32.2	0.080	8.6

Q-PAA6

CZI-47-1 (Combined)

Feb 26, 2013 07:52:00

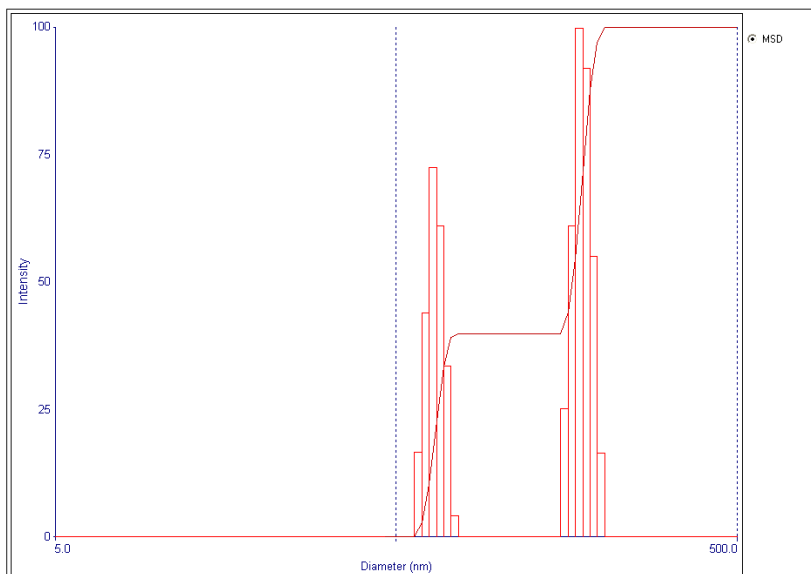
Effective Diameter: **106.4 nm**

Polydispersity: **0.182**

Avg. Count Rate: **454.3 kcps**

Baseline Index: **7.0**

Elapsed Time: **00:01:30**



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	105.0	43.4	0.171	4.0
2	107.9	47.4	0.193	9.8
Mean	106.5	45.4	0.182	6.9
Std. Error	1.5	2.0	0.011	2.9
Combined	106.4	45.5	0.182	7.0

Q-PAA7

CZI-61-2 (Combined)

Feb 26, 2013 07:54:37

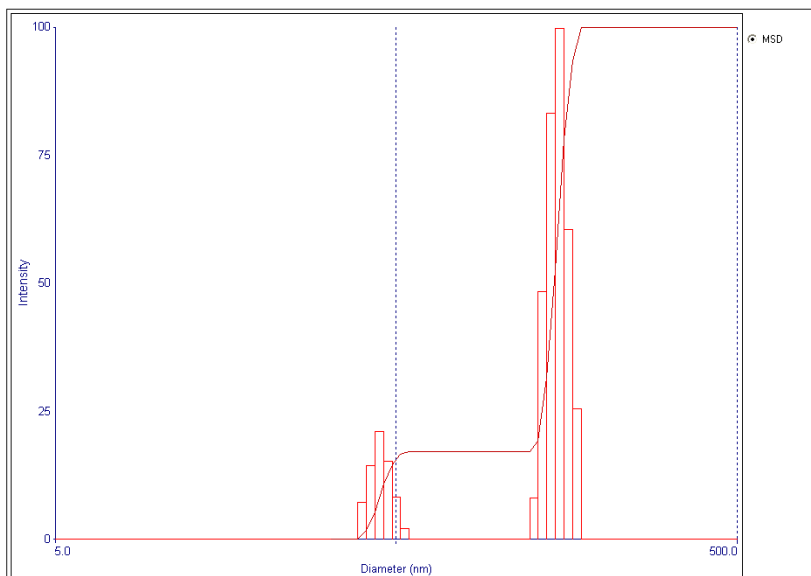
Effective Diameter: **110.5 nm**

Polydispersity: **0.188**

Avg. Count Rate: **241.3 kcps**

Baseline Index: **7.8**

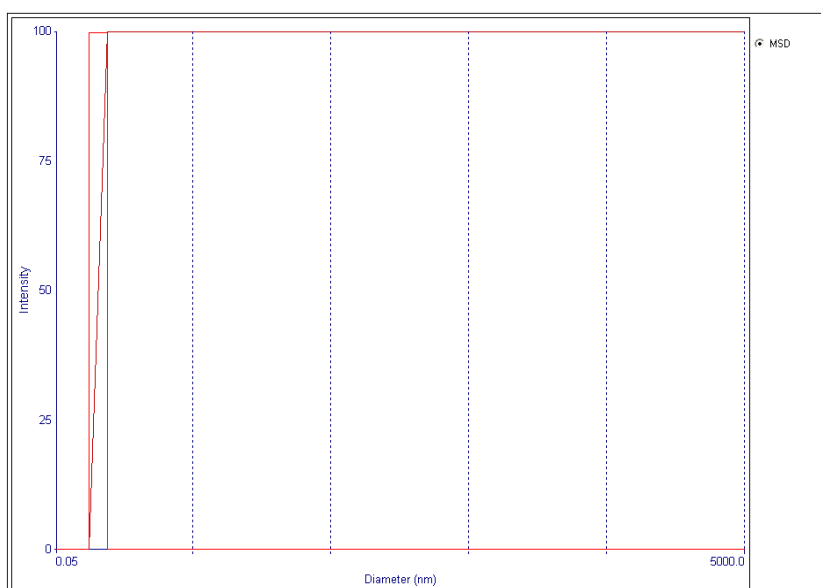
Elapsed Time: **00:01:30**



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	107.3	49.2	0.210	6.2
2	113.6	46.5	0.167	9.3
Mean	110.4	47.8	0.189	7.8
Std. Error	3.1	1.4	0.021	1.5
Combined	110.5	47.9	0.188	7.8

Q-PAA8

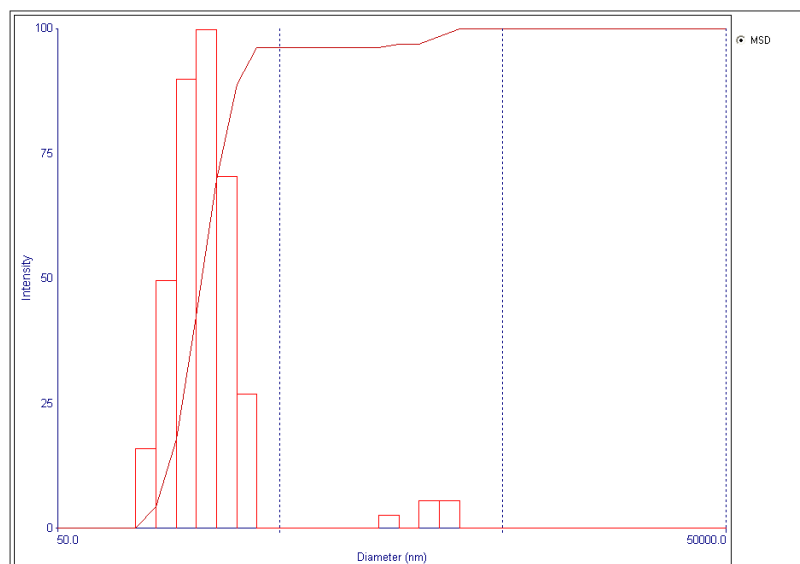
CZI-61-3 (Combined)
Feb 26, 2013 07:57:14
Effective Diameter: 258.7 nm
Polydispersity: 0.288
Avg. Count Rate: 301.8 kcps
Baseline Index: 0.0
Elapsed Time: 00:01:30



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	252.7	140.2	0.308	3.5
2	262.9	140.7	0.286	0.0
Mean	257.8	140.5	0.297	1.8
Std. Error	5.1	0.2	0.011	1.9
Combined	258.7	138.9	0.288	0.0

Q-PAA9

CZI-46-6 (Combined)
Feb 26, 2013 07:48:29
Effective Diameter: 211.7 nm
Polydispersity: 0.170
Avg. Count Rate: 505.9 kcps
Baseline Index: 9.3
Elapsed Time: 00:01:30



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	208.9	93.1	0.199	9.3
2	214.3	81.1	0.143	9.3
Mean	211.6	87.1	0.171	9.3
Std. Error	2.7	6.0	0.028	0.0
Combined	211.7	87.2	0.170	9.3

Q-PAA10

CZI-61-4 (Combined)

Feb 26, 2013 07:59:48

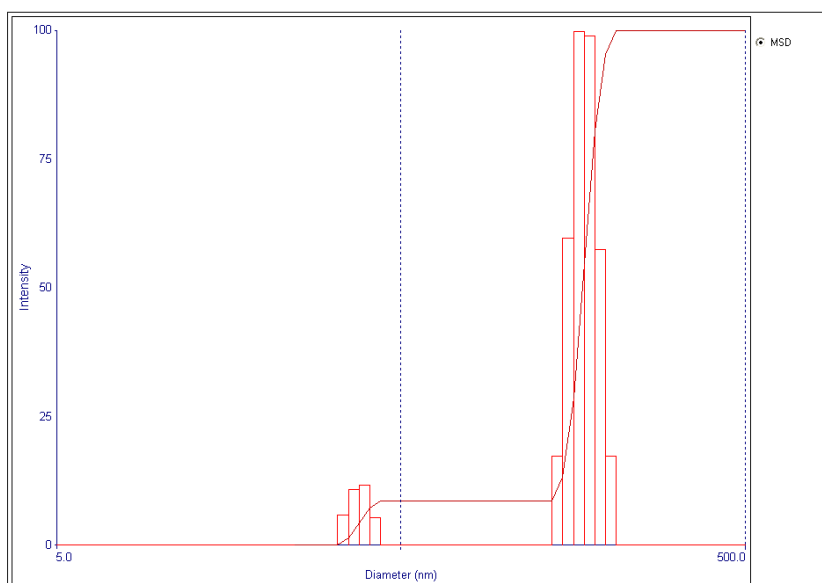
Effective Diameter: 142.1 nm

Polydispersity: 0.191

Avg. Count Rate: 205.2 kcps

Baseline Index: 8.5

Elapsed Time: 00:01:30



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	139.2	63.3	0.207	9.5
2	144.9	61.3	0.179	7.5
Mean	142.1	62.3	0.193	8.5
Std. Error	2.9	1.0	0.014	1.0
Combined	142.1	62.1	0.191	8.5

Q-PAA11

CZI-65-1 (Combined)

Feb 26, 2013 08:02:39

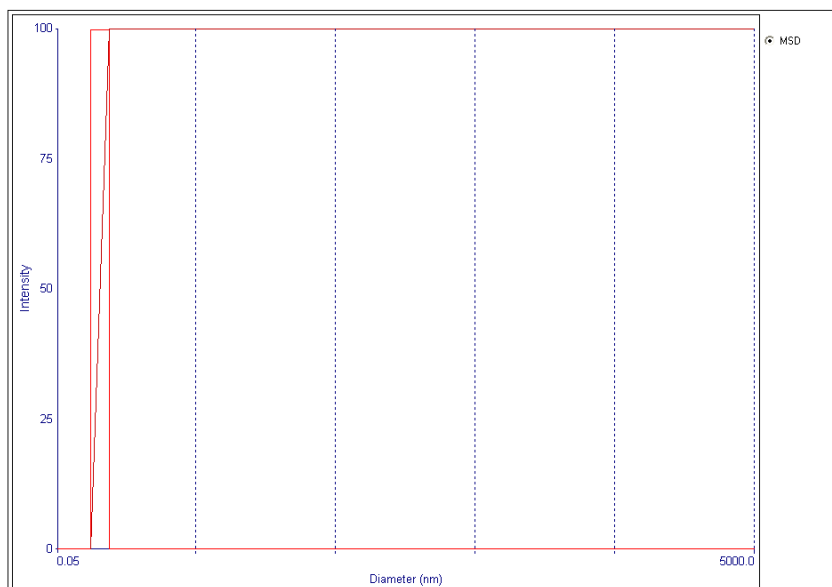
Effective Diameter: 621.2 nm

Polydispersity: 0.321

Avg. Count Rate: 419.7 kcps

Baseline Index: 6.8

Elapsed Time: 00:01:30

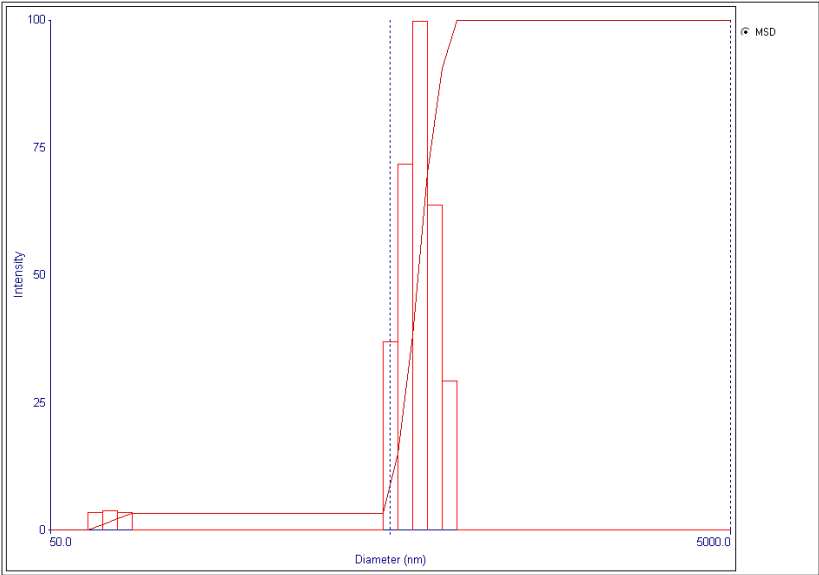


Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	652.0	394.2	0.366	9.0
2	577.6	317.3	0.302	2.7
Mean	614.8	355.7	0.334	5.9
Std. Error	37.2	39.5	0.032	3.1
Combined	621.2	351.9	0.321	6.8

ANEXO 2. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico Quitosano-Poliácido aspártico preparada con el orden inverso de la adición de los reactivos

CZI-71-1 (Combined)
Mar 4, 2013 07:28:24

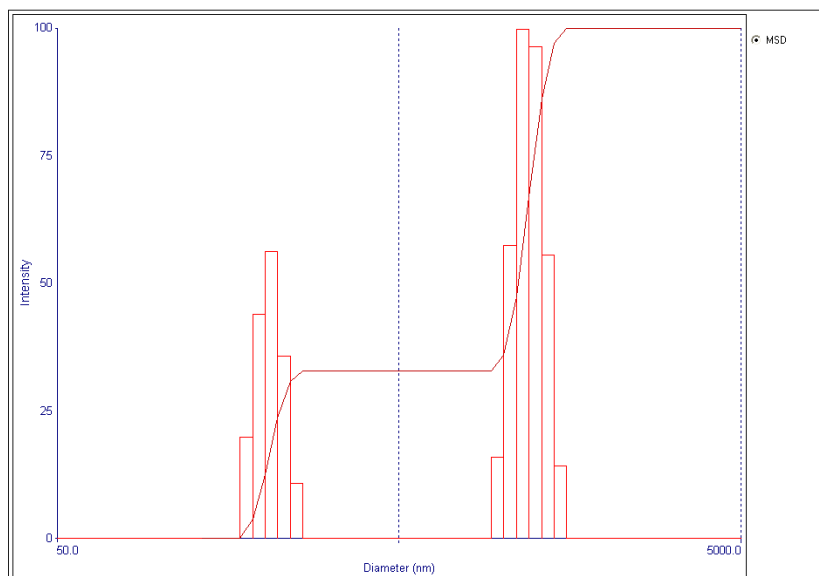
Effective Diameter: 516.5 nm
Polydispersity: 0.200
Avg. Count Rate: 353.3 kcps
Baseline Index: 1.7
Elapsed Time: 00:01:30



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	482.6	226.1	0.219	1.8
2	553.7	234.1	0.179	2.3
Mean	518.2	230.1	0.199	2.1
Std. Error	35.6	4.0	0.020	0.3
Combined	516.5	231.0	0.200	1.7

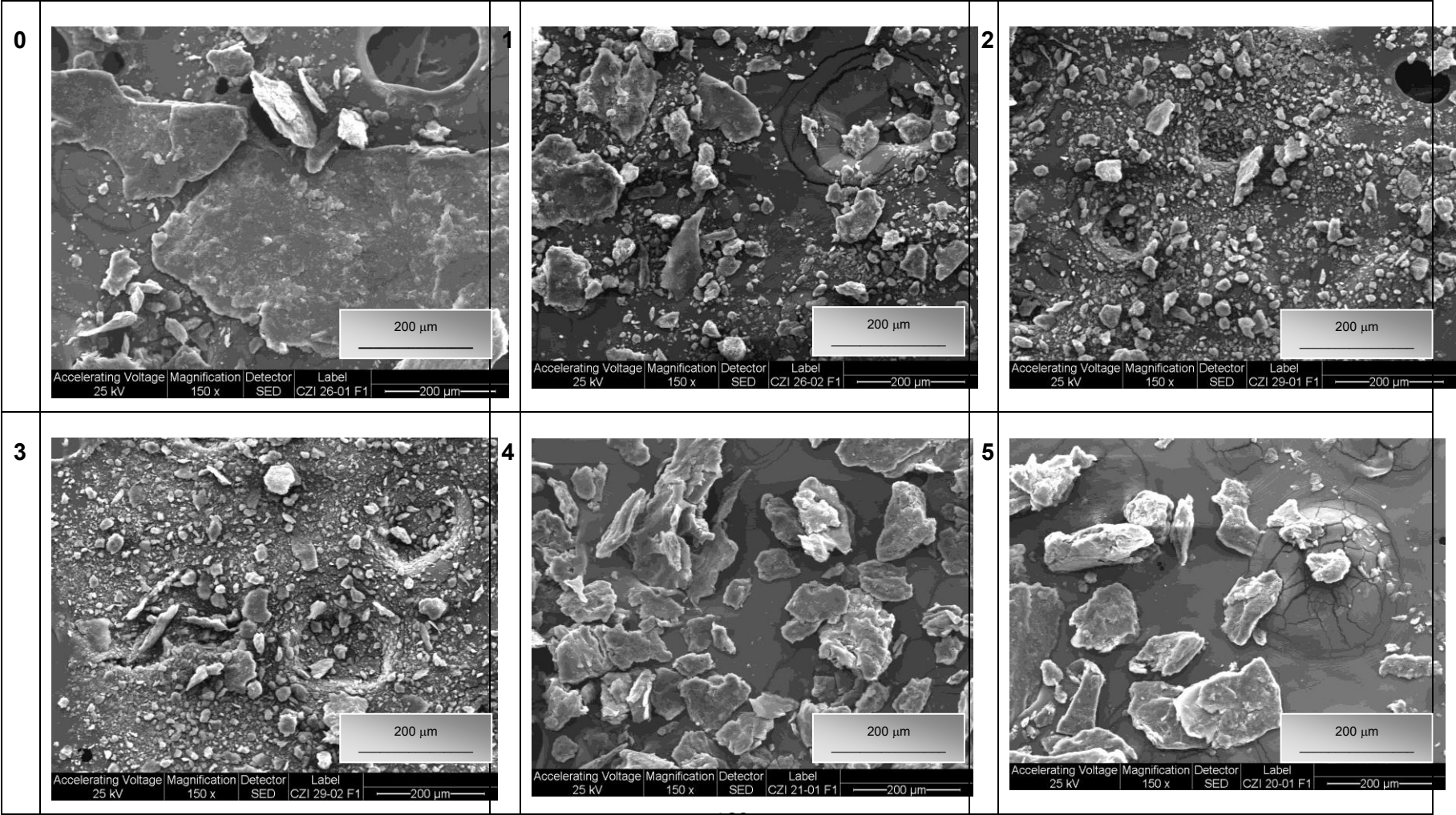
ANEXO 3. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico Q-PAA10 resuspendido en agua

Unknown Sample (Combined)
Dec 16, 2013 07:30:42
Effective Diameter: 535.9 nm
Polydispersity: 0.345
Avg. Count Rate: 144.8 kcps
Baseline Index: 0.0
Elapsed Time: 00:00:45

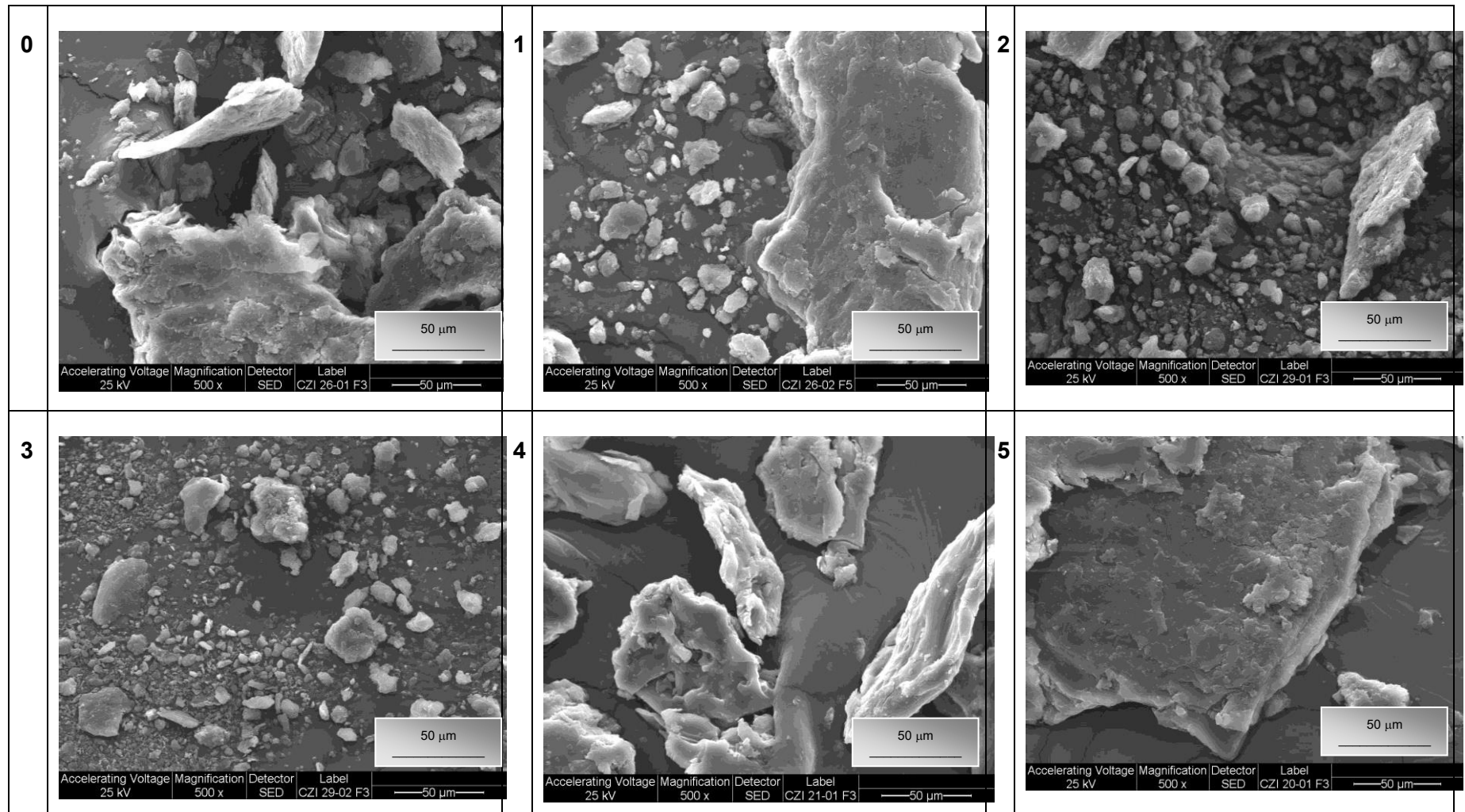


Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	515.3	328.2	0.406	8.3
2	532.6	299.7	0.317	9.8
3	547.7	326.2	0.355	0.0
Mean	531.8	318.0	0.359	6.0
Std. Error	9.4	9.2	0.026	3.0
Combined	535.9	314.7	0.345	0.0

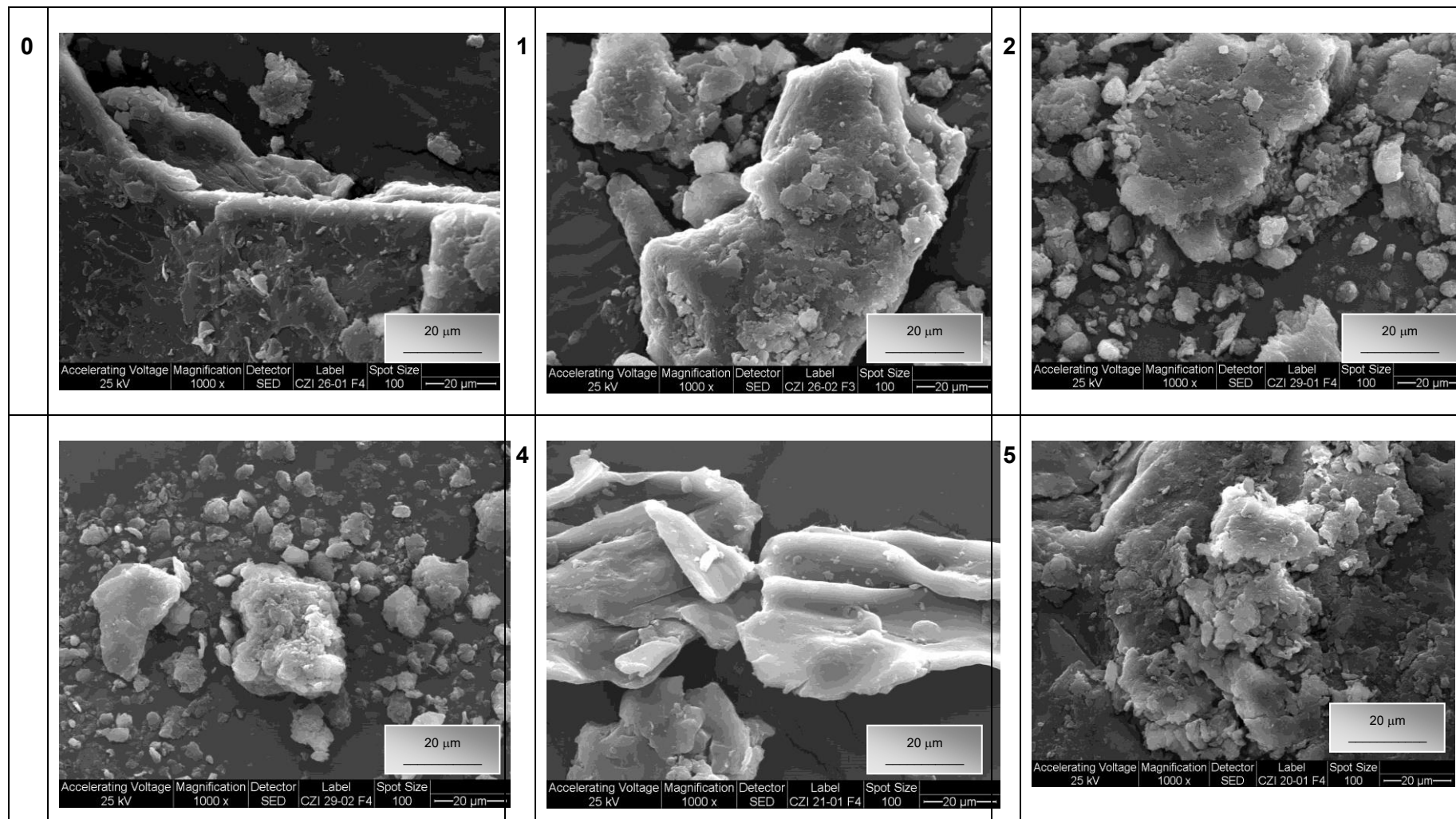
ANEXO 4. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado a una magnificación de 150, 500 y 1000X
Magnificación de 150X




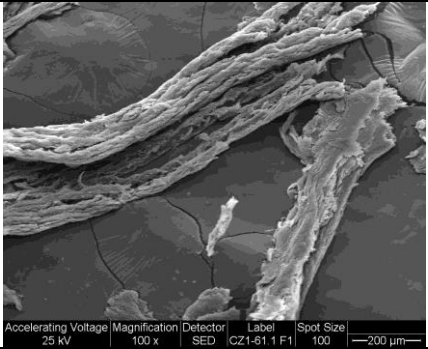
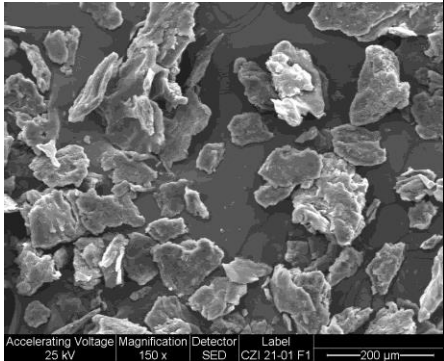

Magnificación de 500X



Magnificación de 1000X

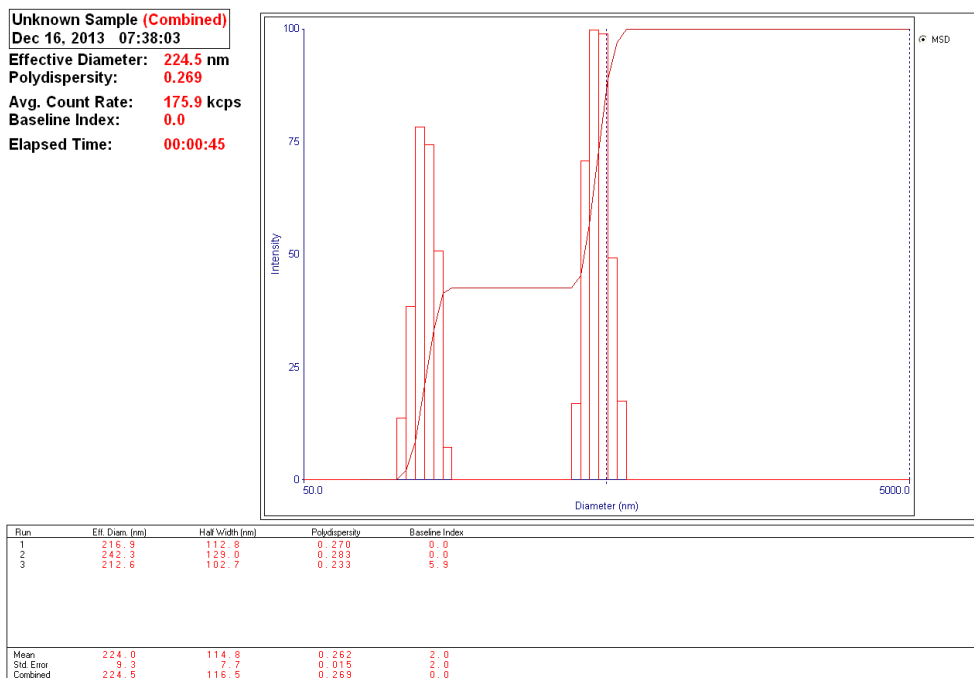


ANEXO 5. Imágenes SEM del complejo interpolimérico quitosano-poliácido aspártico liofilizado y secado a 40 °C en placas petri a las magnificaciones de 100 y 150X, respectivamente.

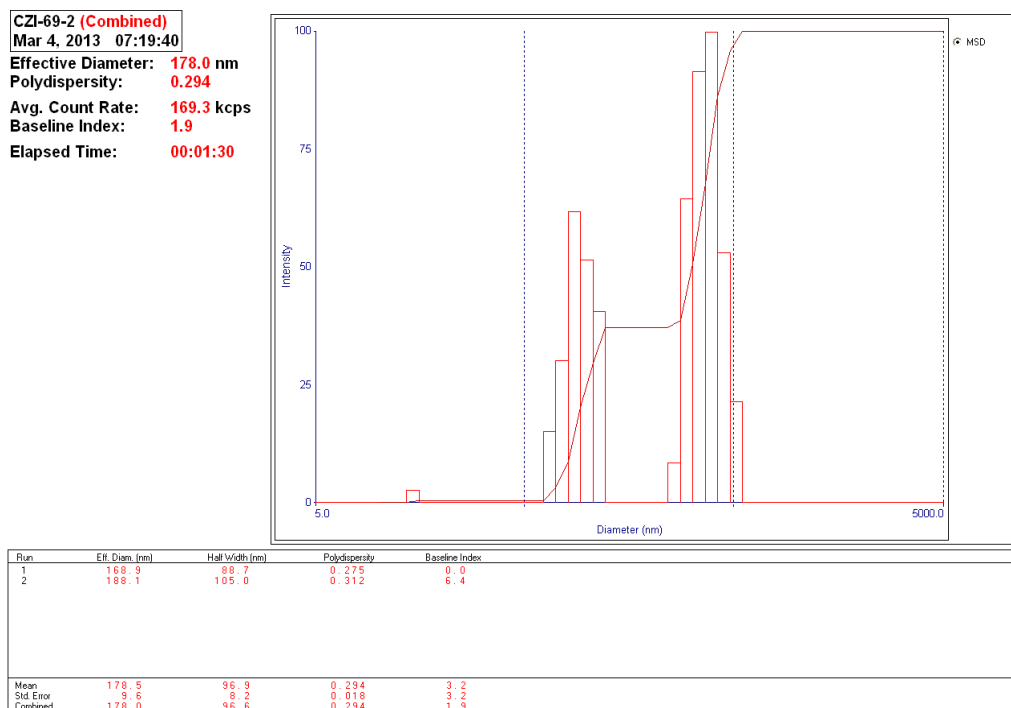
Magnificación X	LIOFILIZADO	SECADO A 40 °C EN PLACAS PETRI
100		
150		

ANEXO 6. Distribución del tamaño de nanopartículas por DLS de Isoniazida encapsulada en el complejo interpolímero Quitosano-Poliácido aspártico

I/Q-PAA1



I/Q-PAA2



I/Q-PAA3

CZI-69-4 (Combined)

Mar 4, 2013 07:25:44

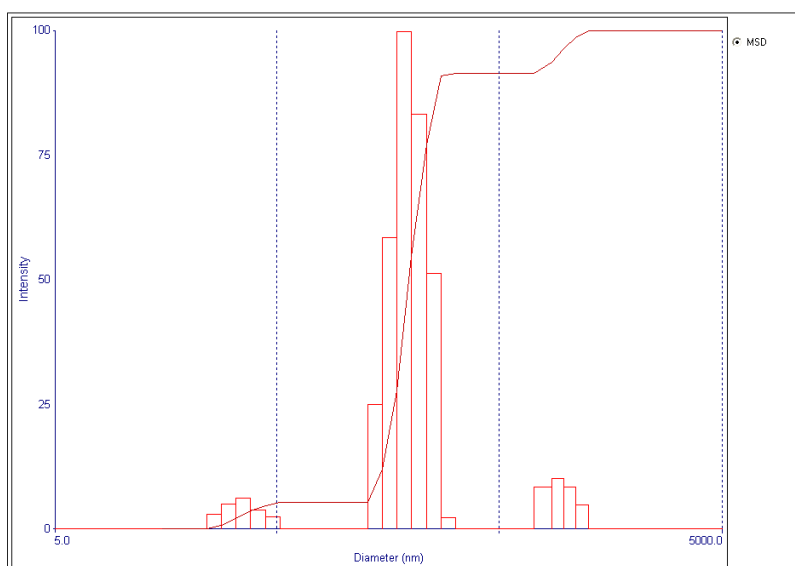
Effective Diameter: **184.1 nm**

Polydispersity: **0.223**

Avg. Count Rate: **367.9 kcps**

Baseline Index: **6.5**

Elapsed Time: **00:01:30**



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	182.5	86.7	0.226	3.9
2	184.8	88.8	0.231	9.1
Mean	183.6	87.7	0.228	6.5
Std. Error	1.1	1.1	0.003	2.6
Combined	184.1	86.9	0.223	6.5

I/Q-PAA4

CZI-69-3 (Combined)

Mar 4, 2013 07:22:14

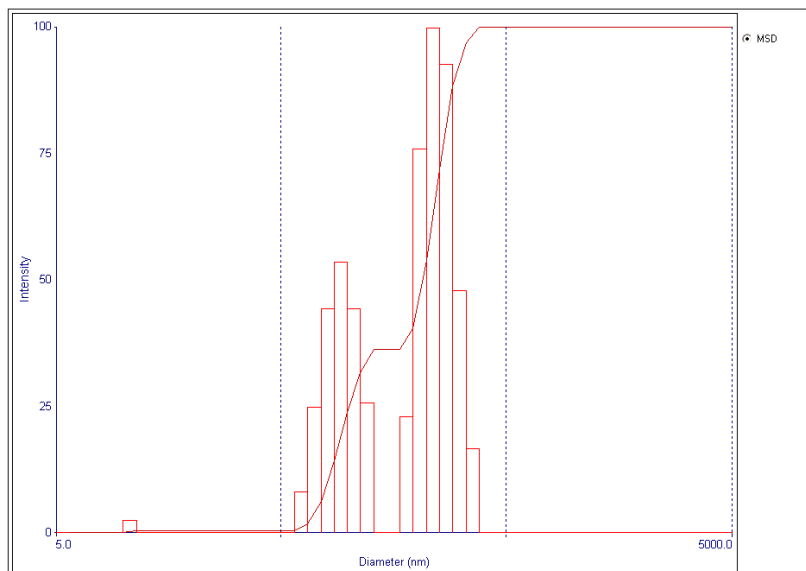
Effective Diameter: **148.5 nm**

Polydispersity: **0.221**

Avg. Count Rate: **249.8 kcps**

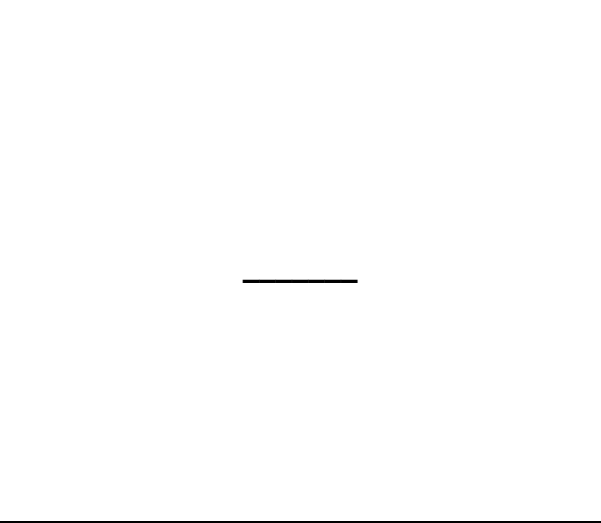
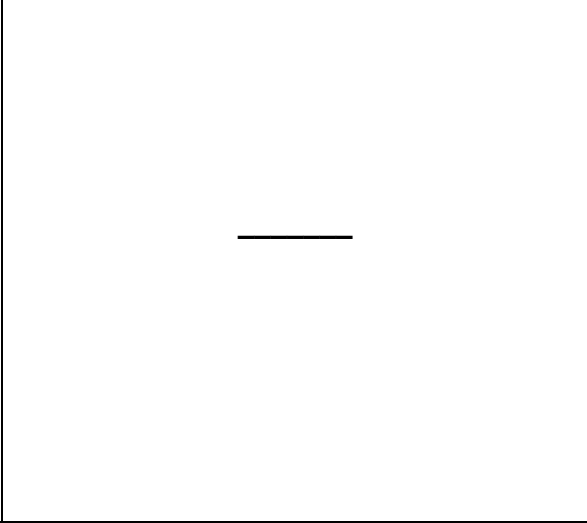
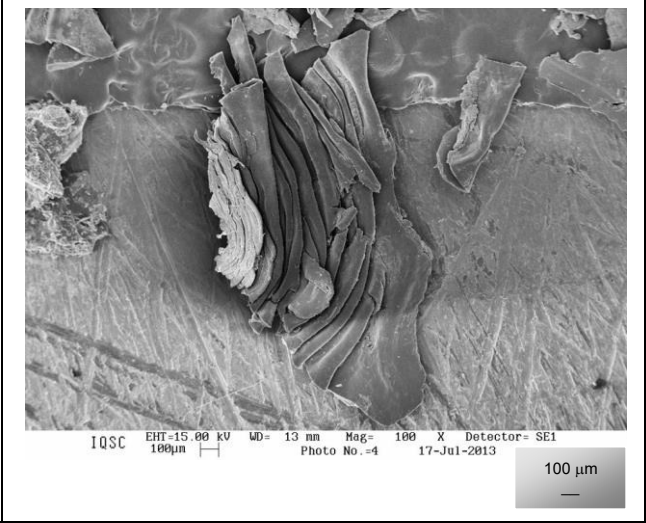
Baseline Index: **6.8**

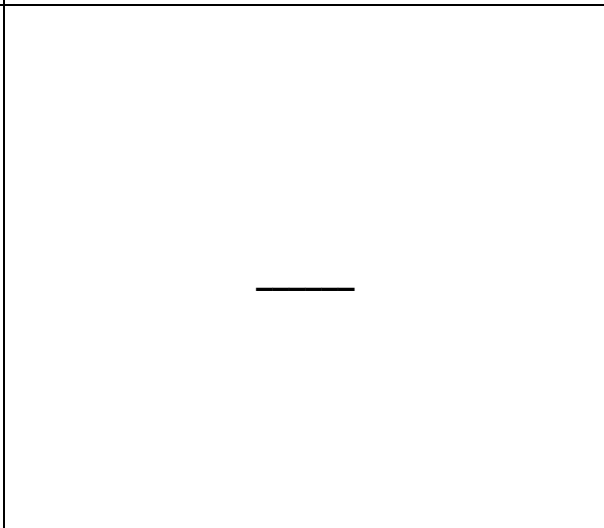
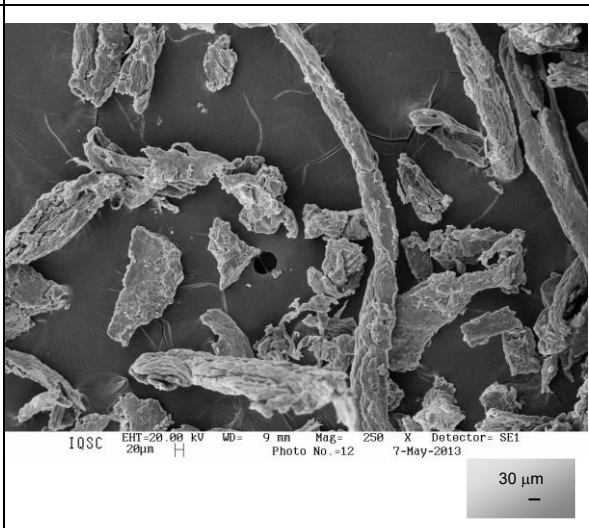
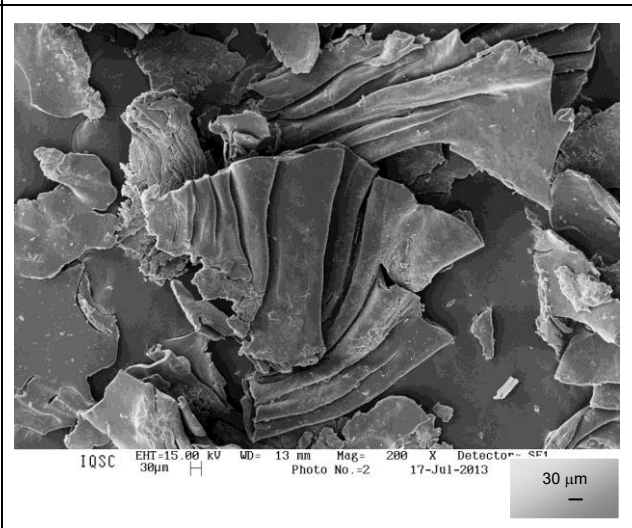
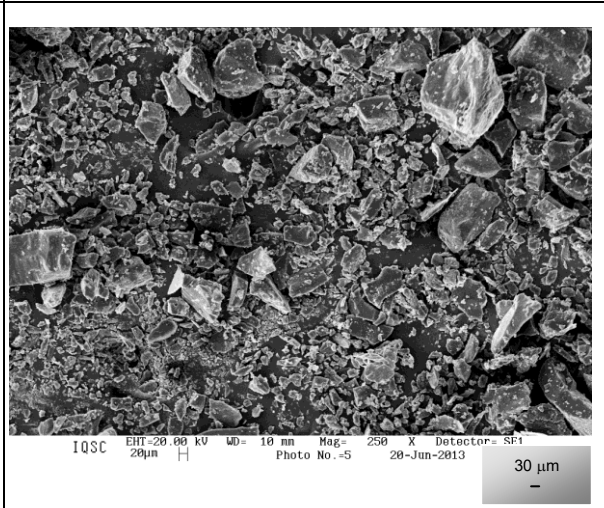
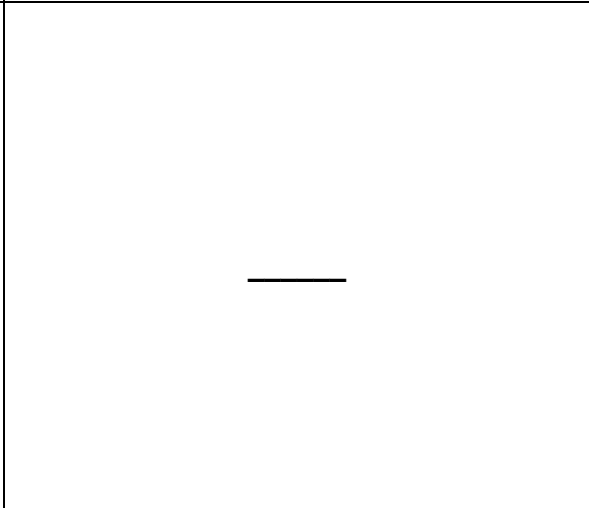
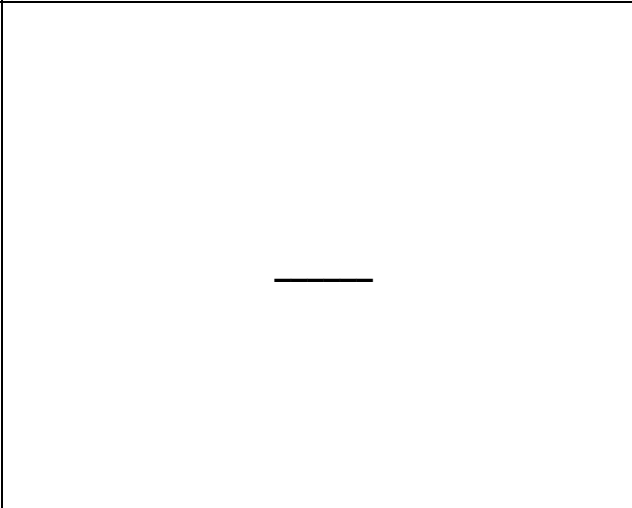
Elapsed Time: **00:01:30**

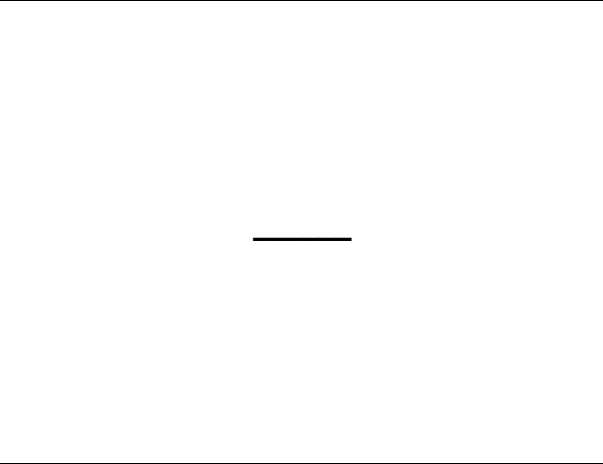
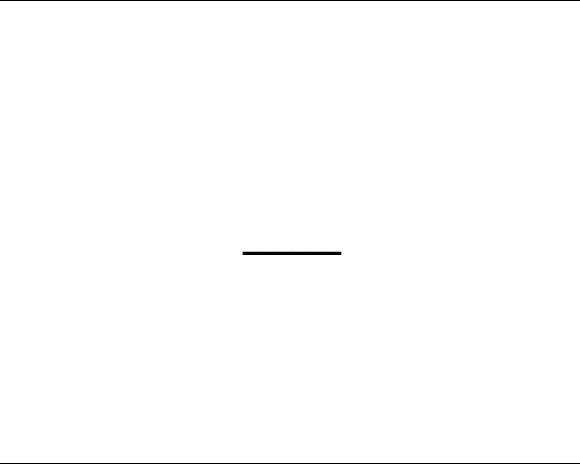
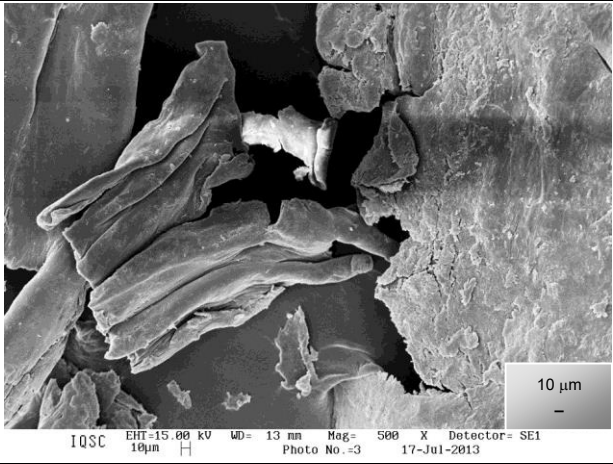
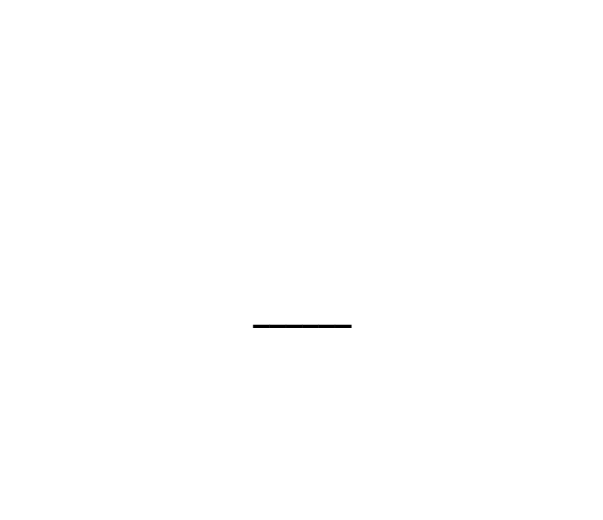
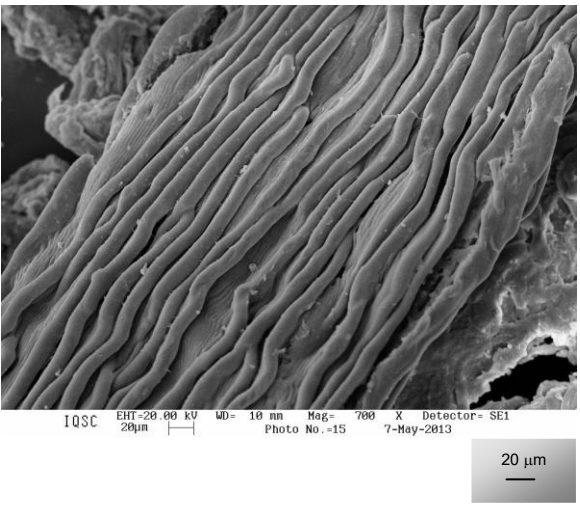
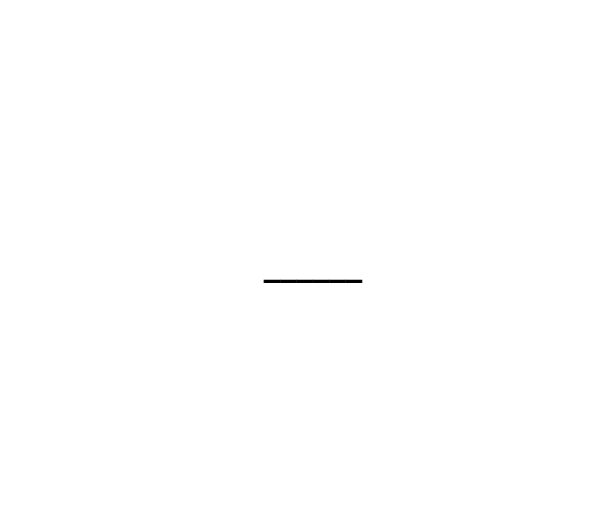


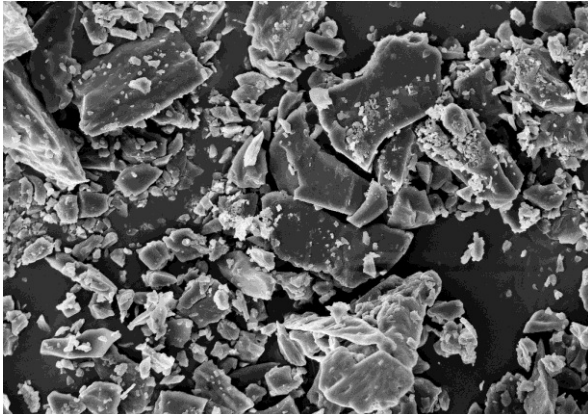
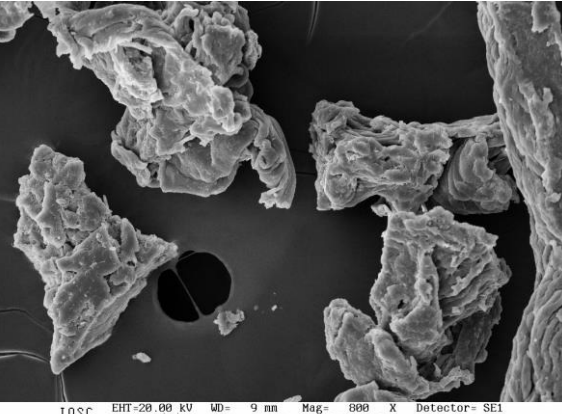

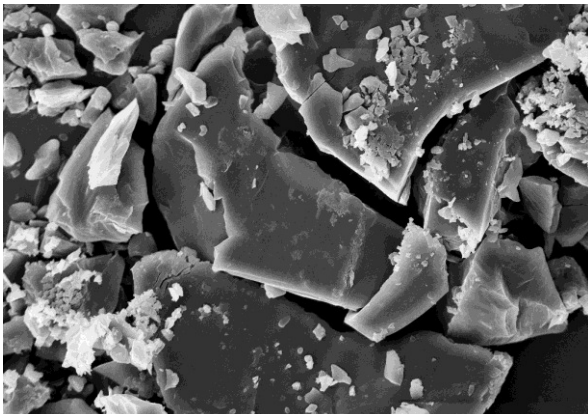
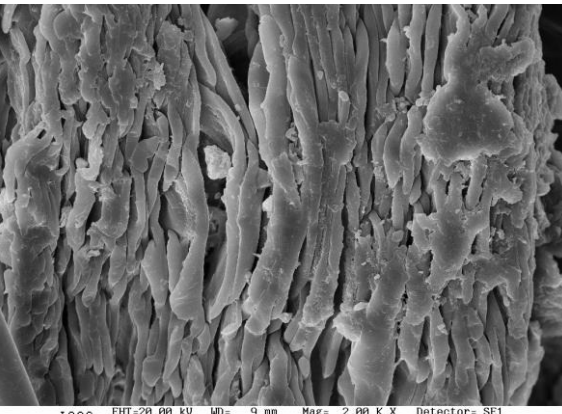
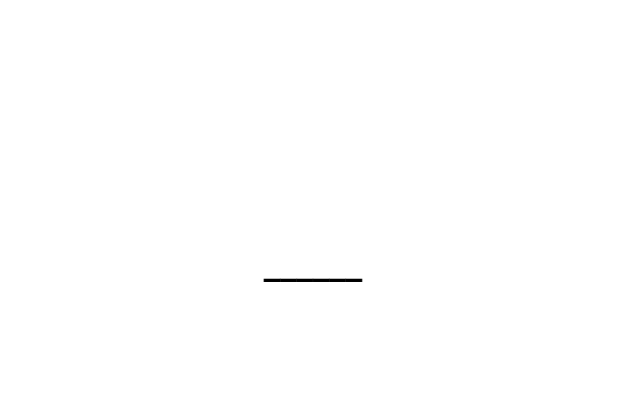
Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	149.5	71.1	0.227	5.4
2	147.5	68.8	0.218	8.3
Mean	148.5	70.0	0.222	6.9
Std. Error	1.0	1.2	0.004	1.5
Combined	148.5	69.9	0.221	6.8

ANEXO 7. Imágenes SEM de la isoniazida libre, del encapsulamiento I/QPAA4s y del complejo interpolimérico Q-PAA10s
a las magnificaciones de 100, 200, 250, 500, 700, 800 y 2000X

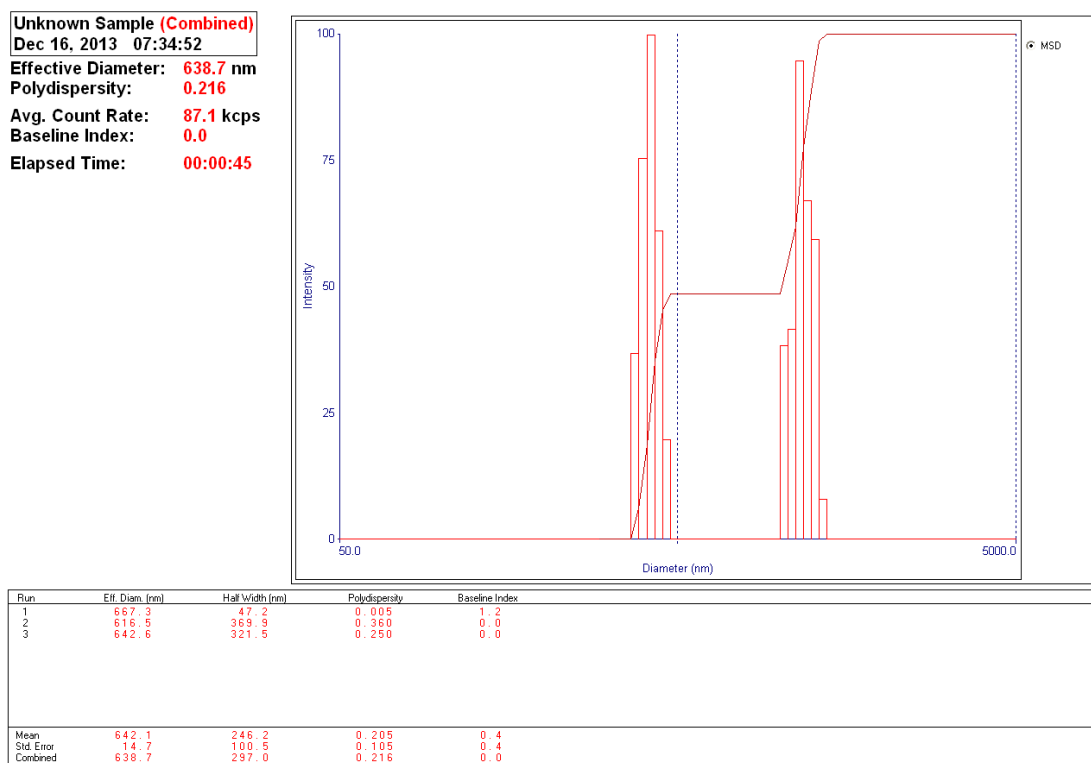
Magnificación	Isoniazida libre	Encapsulamiento (I/QPAA4s)	Complejo interpolimérico (Q-PAA10s)
100X			

Magnificación	Isoniazida libre	Encapsulamiento (I/QPAA4s)	Complejo interpolimérico (Q-PAA10s)
200X			
250X			

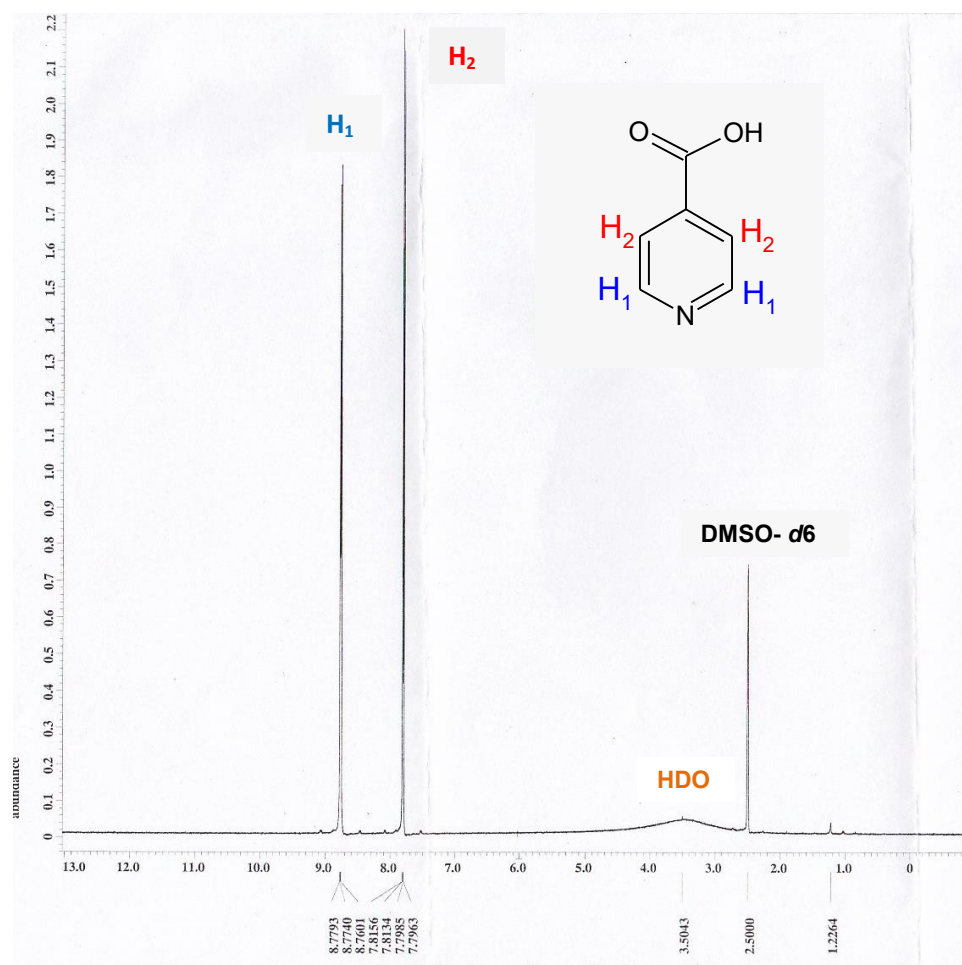
Magnificación	Isoniazida libre	Encapsulamiento (I/QPAA4s)	Complejo interpolimérico (Q-PAA10s)
500X			
700X			

Magnificación	Isoniazida libre	Encapsulamiento (I/QPAA4s)	Complejo interpolimérico (Q-PAA10s)
800X			
2000X			

ANEXO 8. Distribución del tamaño de las nanopartículas por DLS del encapsulamiento I/QPAA4s resuspendido en agua



ANEXO 9. Espectro RMN-¹H del Ácido Isonicotínico en DMSO-d₆



Nota: Se observa que el reactivo ácido isonicotínico posee una alta pureza.

En el espectro RMN-¹H del ácido isonicotínico, el hidrógeno H₁ del anillo resuena a aproximadamente 8,7 ppm, mientras que el hidrógeno H₂ aparece a 7,8 ppm. El solvente DMSO es observado a 2,5 ppm y el residuo de agua presente, HDO, aparece a 3,52 ppm, el cual ha sufrido un ligero desplazamiento desde 3,32 ppm por la presencia del grupo carboxilo, cuyo hidrógeno del OH no se observa en el espectro porque ha sufrido intercambio de COOH a COOD.